

明細書

虚血性神経障害治療又は予防剤

技術分野

- 5 本発明は、ペニシリウム・エスピー (Penicillium sp.) S P F - 3 0 5 9 株を培養することにより得られるキサントン骨格又はクロメン骨格を有する化合物またはその薬学上許容される塩を有効成分として含有する虚血性神経障害治療剤又は予防剤に関する。

10 背景技術

中枢神経系および末梢神経系の幾つかの細胞変性疾患において、虚血が関与していることが報告されている。網膜神経疾患においても緑内障、網膜中心動脈閉塞症、網膜中心動脈分枝閉塞症、網膜中心静脈閉塞症、網膜中心静脈分枝閉塞症、虚血性視神経症、糖尿病性網膜症、黄斑変性症および未熟児網膜症等で虚血による障害

15 の関与が考えられている。

(1) 緑内障 (glaucoma)

- 緑内障は40才以上で発症率が3.5%である網膜疾患で、わが国では192万人、世界中で1億500万人の患者が推定されている。症状としては、眼圧上昇を基調とし、網膜萎縮、視神経乳頭の陥没を起こす。予後が悪く、最悪の場合には失明までに至る
- 20 場合があり、日本では失明原因の第4位、米国では年間12万人もの患者が報告されている。

- 緑内障は、眼圧上昇が基調となるため、眼圧降下を目的とした薬剤が多く開発されてきた。作用点の違いによって、副交感神経作動薬、交感神経刺激剤、交感神経β遮断剤、炭酸脱水素酵素阻害剤、高浸透圧剤の5つに分類されるが、全て眼圧降下
- 25 によって薬効を示す。しかし眼圧を下げてても予後が悪く、視神経への障害をきたす症例が認められる。また、眼圧上昇を伴わない緑内障、すなわち低眼圧緑内障が数多く報告され、米国では眼圧上昇を付随した緑内障患者200-300万人に対して、低眼

圧緑内障は100万人もの患者が推定されている。従って眼圧降下を目的としたものでなく、視神経細胞に対して直接に保護効果をもたらす薬剤が望まれる。

(2) 網膜中心動脈閉塞症 (central retinal artery occlusion)

5 網膜中心動脈閉塞症は、網膜中心動脈の篩状板通過点で血栓が詰まることによって発症する。症状としては、片眼性の急激な視力低下を起こし、視神経萎縮を引き起こす。慢性の虚血とは異なり、後に血管の新生は認められない。網膜中心動脈は終動脈であるため、急性の虚血状態が30～40分間続くと不可逆な変化を起こし、網膜は壊死に至る。従って完全閉塞の場合は視力予後は不良である。

10 治療法は、発見後直ちに眼球マッサージを行い、血流再開に努める。薬物処置としては、血栓溶解を目的として、ウロキナーゼ+デキストランを、血管拡張・血栓形成阻止を目的として、プロスタグランディンE₁ (アルプロスタジル) を使用する。

(3) 網膜中心動脈分枝閉塞症 (branch retinal artery occlusion)

15 網膜中心動脈分枝閉塞症は、血栓が眼内の分枝部で詰まり、その支配領域のみに障害が発症するものである。治療法は、網膜中心動脈閉塞症と同様に行われている。

(4) 網膜中心静脈閉塞症 (central retinal vein occlusion) / 網膜中心静脈分枝閉塞症 (branch retinal vein occlusion)

20 網膜中心静脈閉塞症〔出血の有無により、出血性網膜症 (hemorrhagic retinopathy) と静脈うっ滞網膜症 (venous stasis retinopathy) に分類される。〕および網膜中心静脈分枝閉塞症は、篩状板に発生した血栓によるものである。

出血性網膜症は、老人に起きることが多く、半数以上が動脈硬化を原因としている。症状としては、視神経乳頭を中心として、神経線維の走行に沿って、網膜表層に火炎状に広がる出血を起こし、視力の著しい低下を引き起こす。

25 治療法としては、網膜中心動脈閉塞症と同様にウロキナーゼ+デキストランを使用し、血管強化を目的としてカルバゾクロムスルホン酸ナトリウムまたはメシル酸アドレノクロムグアニルヒドラゾンを用いる。また、黄斑浮腫あるいは新生血管

の防止のため、レーザー光凝固を行う。

静脈うっ滞網膜症は、炎症を起因とするものと動脈硬化を起因とするものが知られており、前者は若者、後者は老人に多く見られる。症状としては、静脈の強い拡張、蛇行、さらに視神経乳頭の発赤が起きるが、視力低下は出血型に比べて軽微である。

治療法は出血性と同じ薬物処置を行うが、レーザー光凝固は行わない。

(5) 虚血性視神経症 (ishchemic optic neuropathy)

虚血性視神経症は、栄養血管の閉塞により、視神経に虚血壊死が生じ、視機能障害が現れる病気であり、前部虚血性視神経症 (anterior ishchemic optic neuropathy) とも呼ばれる。

原因としては、側頭動脈炎と、動脈硬化症、高血圧症、糖尿病などの全身疾患により発症する特発性虚血性視神経症に分けられる。

治療法は薬物治療のみがとられる。浮腫を軽減する目的で、ステロイド(プレドニゾン)が、篩状板付近の血流改善を目的として、眼圧降下剤(炭酸脱水酵素阻害剤、アセタゾラミド)が、神経賦活を目的として、ビタミンB₁、B₁₂が適用されている。

(6) 糖尿病性網膜症

糖尿病性網膜症は、数年以上の高血糖持続により、細小血管内皮細胞の変性、壊死、血栓形成、血液凝固能亢進から細小血管閉塞が起こり、虚血状態となり発症する。インシュリン依存性で39%、非依存性で47%の患者が発病し、日本国内で約60万人の患者が推定されている。

治療法として、単純期では全身性に血糖値のコントロールをし、出血のある場合は血管強化剤、ストレプトキナーゼ・ストレプトドルナーゼ(バリダーゼ)を適用し、前増殖期では汎網膜光凝固を行う。さらに増殖期では牽引性網膜剥離を生じた場合硝子体手術を行う。網膜神経の保護を目的とした薬物はなく、補助的にコハク酸トコフェロールカルシウム(ビタミンE)、酢酸トコフェロール(ユベラ)が適用されているのみである。従って虚血時の障害を軽減する新薬開発が望まれる。

(7) 黄斑変性症

黄班部は光軸が通過する網膜部であり、視野の中心部を担い、視力を決定する重要な領域である。黄班変性症は、この部分に異常をきたした症状の総称であり、おもに5つの疾患が知られている。すなわち、中心性漿液性脈絡網膜症(central serous chorioret)、中心性滲出性脈絡網膜症(central exudative chorioretinopathy)、老人性円板状黄班変性(senile disciform macular degeneration)、老人性萎縮性黄班変性(senile atrophic macular degeneration)、特発性硝子体網膜界面黄班症(idiopathic vitreoretinal interface maculopathy)に分類される。

中心性漿液性脈絡網膜症および中心性滲出性脈絡網膜症は、脈絡膜より漿液あるいは出血(滲出)が、破綻した色素上皮細胞を通過して網膜下に滞留する疾患である

老人性円板状黄班変性は黄班部に滲出性の変化と出血、脈絡膜からの血管新生を起こす疾患で、老人性萎縮性黄班変性では滲出性の変化が認められず、網膜色素上皮細胞の萎縮を特徴とする。

特発性硝子体網膜界面黄班症は、黄班部に透明あるいは不透明な網膜前膜が形成し、黄班に走行する血管が蛇行する。

老人性萎縮性黄班変性を除いていずれの疾患も、血管障害に起因することから、虚血性の障害が考えられる。

治療法としては、基本的には新生血管が発生している場合には光凝固による処置を行い、薬物療法としては、網膜下の漿液の吸収を目的として、高滲浸透剤(イソソルビルやグリセリン)の使用、網脈絡膜の循環改善を目的として、カリジノゲナーゼの使用、血管拡張を目的として、ストレプトキナーゼ・ストレプトドルナーゼ(バリダーゼ)の使用、その他、ビタミン剤、ステロイド剤が適用されているが、網膜神経細胞に作用する薬剤はなく新薬開発が期待される。

(8) 未熟児網膜症 (retinopathy of prematurity)

未熟児網膜症は、早産児への高濃度の酸素投与が起因して、未熟な網膜血管の末梢部に閉塞性変化が生じ、酸素投与停止後、低酸素状態になる。その治療法は、冷凍凝固を行う方法等の対症療法的なものであり、根本的な治療を目的とした薬物は

無く、従って虚血時の障害を軽減する新薬開発が望まれる。

また、脳神経疾患または脳血管障害においても、脳塞栓症、一過性脳虚血、鎖骨下動脈盗血症候群、Wallenberg症候群（延髄外側症候群）、脳血栓症、ラクナ梗塞、可逆性虚血性神経障害、脳梗塞、もやもや病（ウィリス動脈輪閉塞症）、低酸素性脳症、静脈洞血栓症、または術後脊髄虚血などで虚血による障害が関与しており、これらの疾患における虚血時の障害を軽減する新薬開発が望まれる。

一方、セマフォリンは、神経成長円錐を退縮させ軸索の伸長を抑制する因子として同定された内因性のタンパク質であり、これまでに約20種の分子種が知られているが、最も良く研究されているのがクラス3型と呼ばれるサブファミリーの遺伝子群である。これらの遺伝子がコードする蛋白質はインビトロで強い神経突起伸長抑制活性、成長円錐退縮活性を有していることが知られている。中でも最も良く研究されているのがセマフォリン3A（Sema3A）（Cell, 75, p217（1993）およびCell, 75, p1389（1993）を参照）であり、この蛋白は10pMという低濃度で短時間のうちに培養神経細胞の成長円錐退縮を誘発する。また、ラット視神経軸索切断モデルにおいて、網膜神経節細胞の細胞死（アポトーシス）を、抗セマフォリン3A抗体が抑制することが知られている（The Journal of Biological Chemistry, 277, p49799（2002）を参照）。前記モデルは軸索（神経線維）のみが切断され、神経脈管構造や視神経への血液供給にはダメージを与えていない創傷障害モデルである。さらに、ウサギを用いた先天性緑内障モデルの網膜において、セマフォリンの発現が上昇していることも知られている（Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 241, p673（2003）を参照）。一方、ラットを用いた中大脳動脈閉塞モデルでは、セマフォリン3AのmRNAが発現していることも知られている（Brain Research, 914, p1（2001）を参照）。

一連のキサントン化合物が、セマフォリン阻害活性を有し、神経再生促進作用を有することが知られている（国際公開第02/09756号パンフレット、国際公開第03/062243号パンフレット及び国際公開第03/062440号パンフレットを参照）。しかし、これらのセマフォリン阻害活性を有する化合物が、虚血時の細胞死（アポトーシス

）、例えば網膜神経細胞死や脳における神経細胞死を抑制し、虚血障害に有効な治療剤又は予防剤として優れた効果を示すことは知られていなかった。

発明の開示

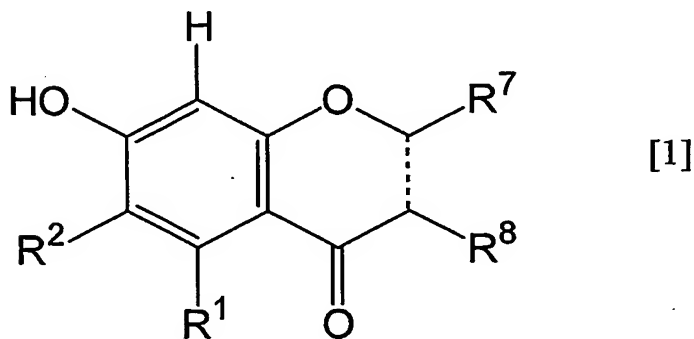
- 5 本発明の課題は、虚血障害を伴う神経障害の治療剤又は予防剤を提供することにある。

本発明者らは、セマフォリン阻害活性を有する化合物が、虚血性障害が関与する神経細胞死を抑制することを見出し、虚血性神経障害の治療剤又は予防剤として有用であることを見出した。

- 10 すなわち、ラット前房室内を、血圧測定装置を用いて約150mmHgの圧力で負荷することにより、眼圧上昇を施行し、虚血性障害を惹起するモデル動物を作成した。該モデル動物に対して、ペニシリウム・エスピー (Penicillium sp.) S P F - 3 0 5 9 株を培養することにより得られるセマフォリン阻害活性を有する化合物を投与したところ、優れた治療効果を示した。従って、セマフォリン阻害活性を有する化合物は、虚血性障害を治療もしくは要望する薬剤として、好ましくは網膜における虚
- 15 血性障害を治療もしくは予防する薬剤として有効であることがわかった。

すなわち、本発明は、

- [1] ペニシリウム・エスピー (Penicillium sp.) S P F - 3 0 5 9 株を培養することにより得られるセマフォリン阻害活性を有する化合物であって、式 [1] :



(式中、破線は単結合若しくは二重結合を表し、 R^1 は水素原子、カルボキシ基又はアルコキシカルボニル基を表し、 R^2 は水素原子、水酸基又はアシルオキシ基を

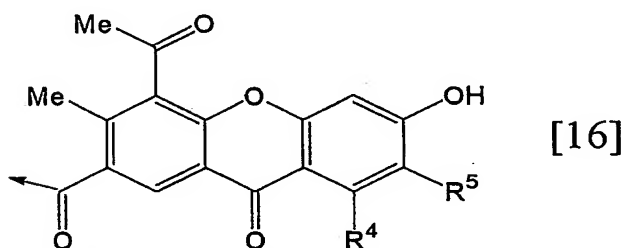
表し、 R^7 及び R^8 は独立して水素原子又は有機基を表す。)

で表される化合物、その誘導体又はそれらの薬学上許容される塩を有効成分として含有する虚血性神経障害治療剤又は予防剤；

〔2〕 式〔1〕で表される化合物が、以下の(1)～(3)のいずれかであるこ

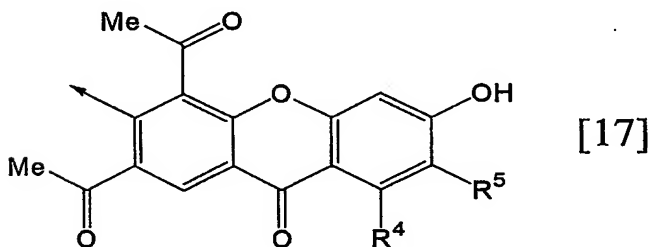
5 とを特徴とする請求項1記載の治療剤又は予防剤；

(1) 式〔1〕において破線は単結合を表し、 R^7 が水素原子を表し、 R^8 が式〔16〕：



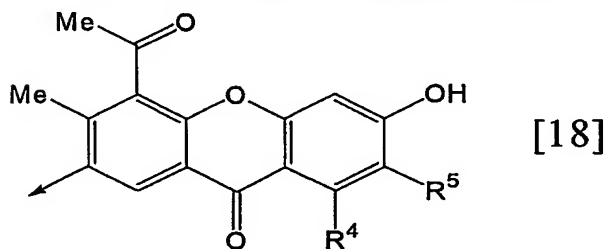
10 (式中、 R^4 は水素原子、カルボキシ基又はアルコキシカルボニル基を表し、 R^5 は水素原子、水酸基又はアシルオキシ基を表す。)を表す；

(2) 式〔1〕において破線は二重結合を表し、 R^7 が水素原子を表し、 R^8 が式〔17〕：



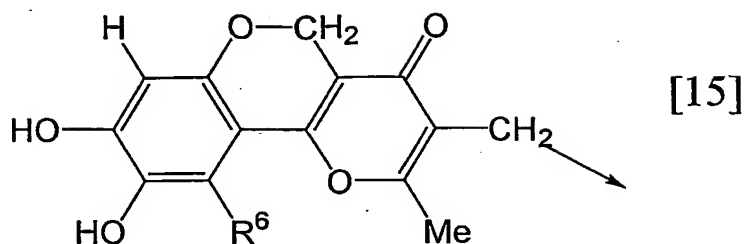
(式中、 R^4 及び R^5 は前記と同義である。)を表す；

15 (3) 式〔1〕において破線は二重結合を表し、 R^7 は式〔18〕：



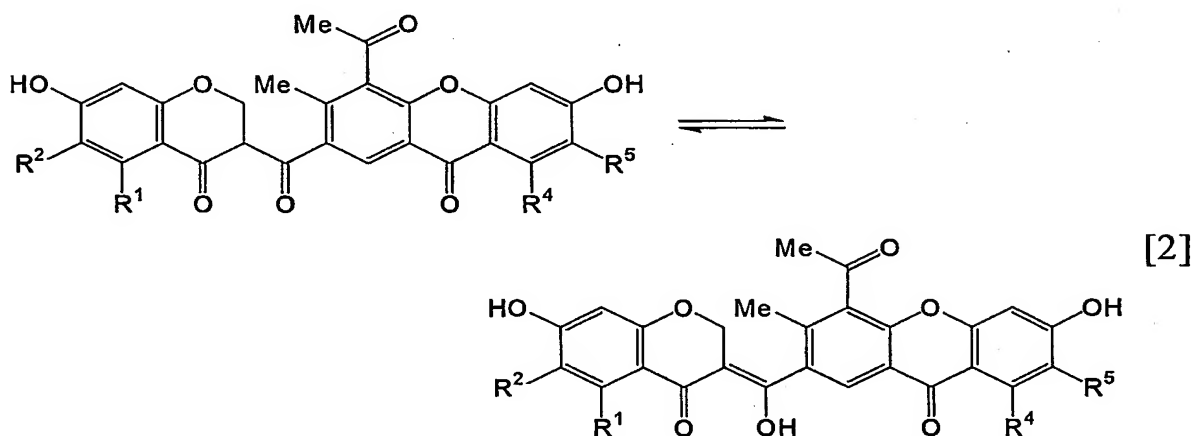
(式中、 R^4 及び R^5 は前記と同義である。)を表し、 R^8 は水素原子、メトキシメチル基又は式〔15〕：

8



(式中 R^6 は水素原子、カルボキシ基又はアルコキシカルボニル基を表す。)を表す；

〔3〕 式〔1〕で表される化合物が、式〔2〕：

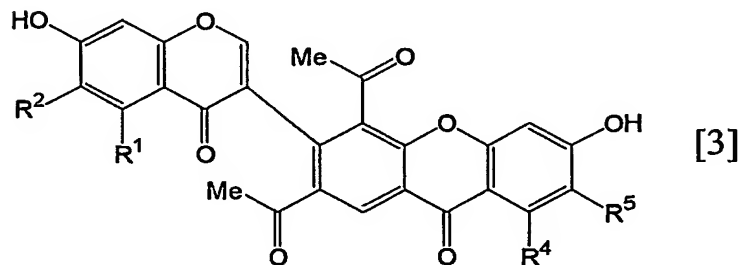


(式中、 R^1 、 R^2 、 R^4 および R^5 は〔1〕又は〔2〕と同義である。)

で表される化合物である、〔2〕に記載の治療剤又は予防剤；

〔4〕 式〔2〕において、 R^1 及び R^4 がカルボキシ基を表し、 R^2 及び R^5 が水酸基を表すことを特徴とする、〔3〕に記載の治療剤又は予防剤；

10 〔5〕 式〔1〕で表される化合物が、式〔3〕：



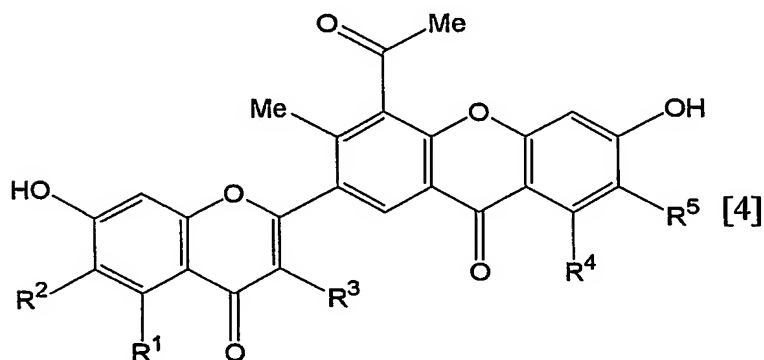
(式中、 R^1 、 R^2 、 R^4 および R^5 は〔1〕又は〔2〕と同義である。)

で表される化合物である、〔2〕に記載の治療剤又は予防剤；

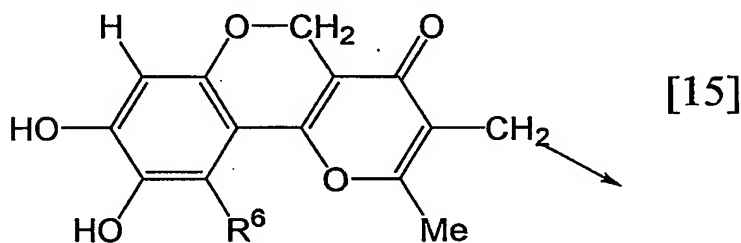
〔6〕 式〔3〕において、 R^1 がカルボキシ基又は水素原子を表し、 R^4 がカル

ボキシ基を表し、 R^2 及び R^5 が水酸基を表すことを特徴とする、〔5〕に記載の治療剤又は予防剤；

〔7〕 式〔1〕で表される化合物が、式〔4〕：



- 5 〔式中、 R^1 、 R^2 、 R^4 、及び R^5 は、〔1〕又は〔2〕と同義であり、 R^3 は水素原子、メトキシメチル基又は式〔15〕：

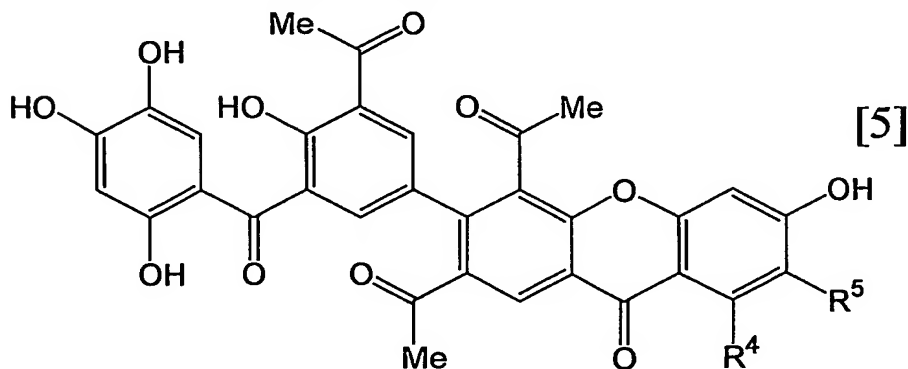


（式中 R^6 は水素原子、カルボキシ基又はアルコキシカルボニル基を表す。）

で表される基を表す。]

- 10 で表される化合物である、〔2〕に記載の治療剤又は予防剤；

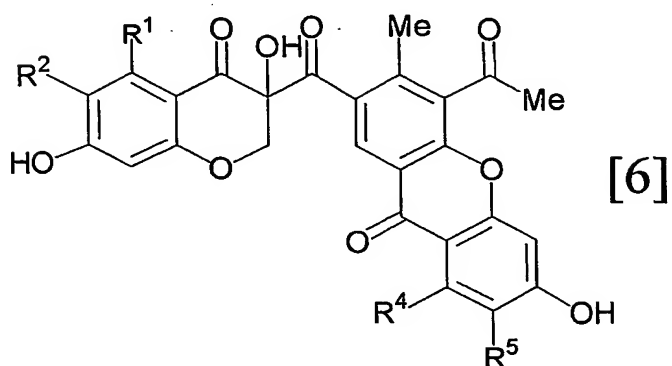
〔8〕 式〔1〕で表される化合物が、式〔5〕：



（式中、 R^4 及び R^5 は、〔2〕と同義である。）

で表される化合物である、〔1〕に記載の治療剤又は予防剤；

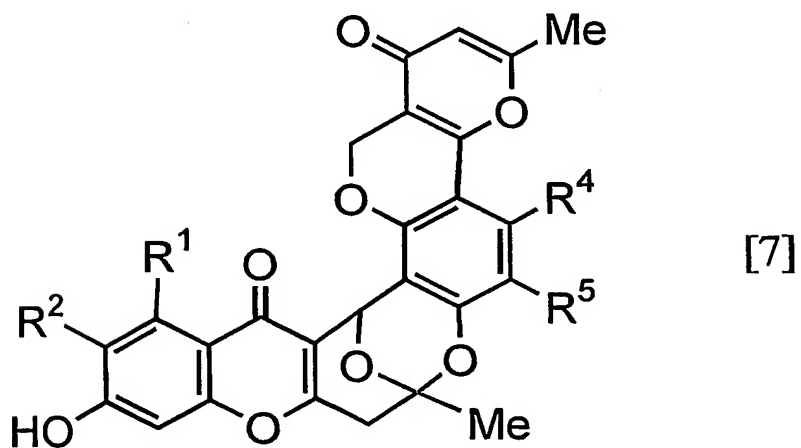
[9] 式[1]で表される化合物が、式[6]：



(式中、 R^1 、 R^2 、 R^4 及び R^5 は、[1] 又は [2] と同義である。)

で表される化合物である、[1] に記載の治療剤又は予防剤；

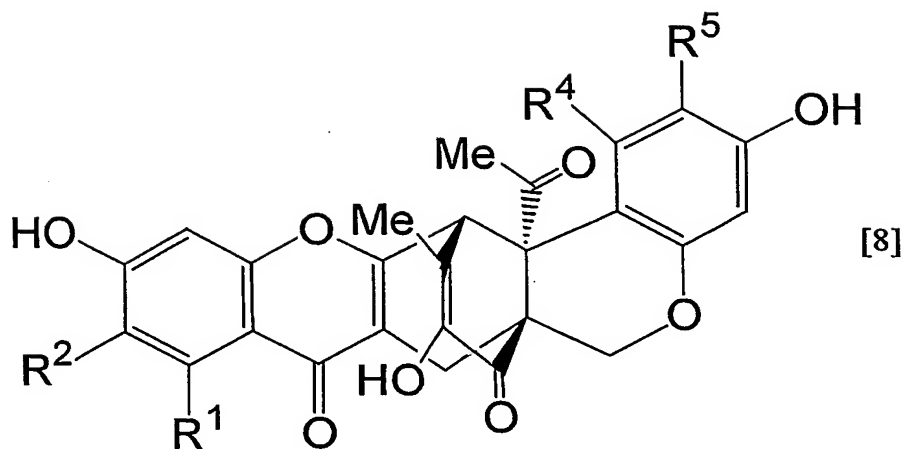
5 [10] 式[1]で表される化合物が、式[7]：



(式中、 R^1 、 R^2 、 R^4 および R^5 は [1] 又は [2] と同義である。)

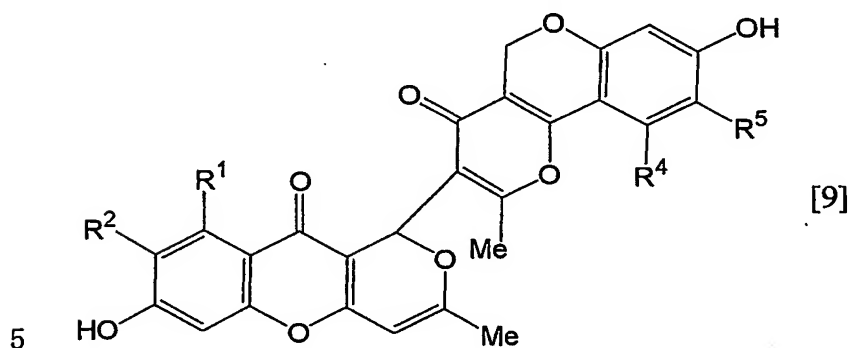
で表される化合物である、[1] に記載の治療剤又は予防剤；

[11] 式[1]で表される化合物が、式[8]：



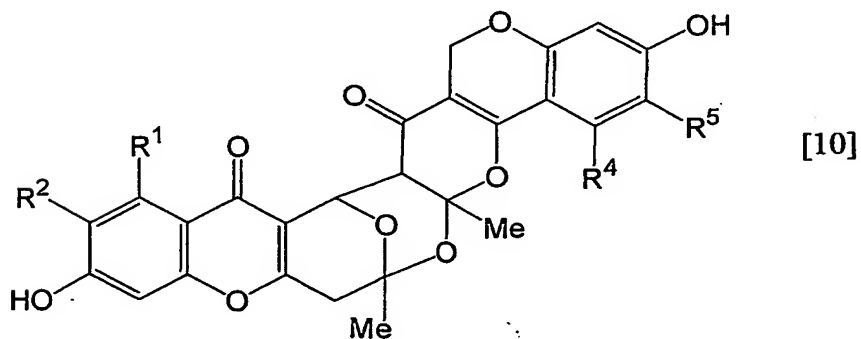
(式中、 R^1 、 R^2 、 R^4 および R^5 は [1] 又は [2] と同義である。)
で表される化合物である、[1] に記載の治療剤又は予防剤；

[12] 式 [1] で表される化合物が、式 [9]：



(式中、 R^1 、 R^2 、 R^4 および R^5 は [1] 又は [2] と同義である。)
で表される化合物である、[1] に記載の治療剤又は予防剤；

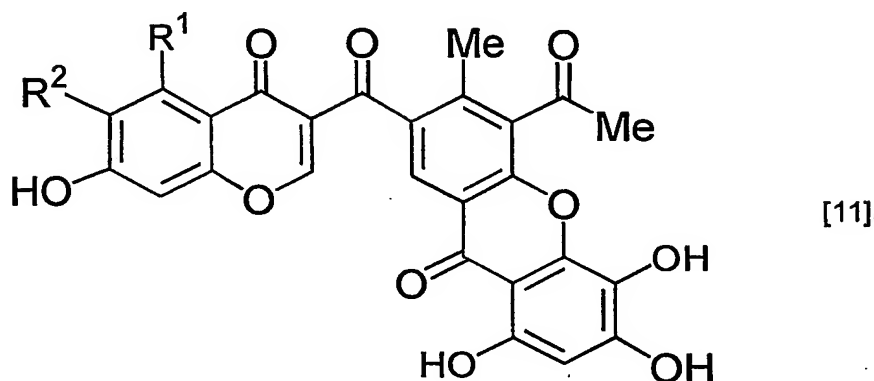
[13] 式 [1] で表される化合物が、式 [10]：



(式中、 R^1 、 R^2 、 R^4 および R^5 は [1] 又は [2] と同義である。)

で表される化合物である、〔1〕に記載の治療剤又は予防剤；

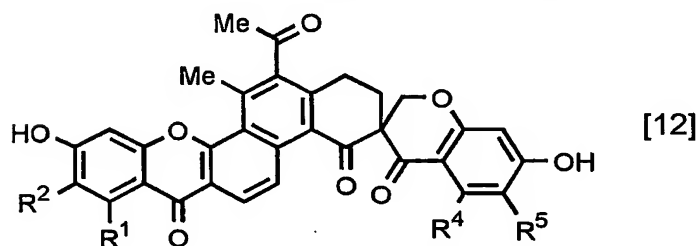
〔14〕 式〔1〕で表される化合物が、式〔11〕：



(式中、R¹ および R² は〔1〕と同義である。)

5 で表される化合物である、〔1〕に記載の治療剤又は予防剤；

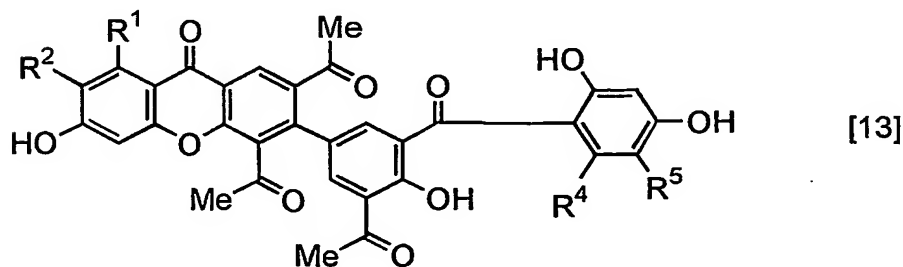
〔15〕 式〔1〕で表される化合物が、式〔12〕：



(式中、R¹、R²、R⁴ 及び R⁵ は、〔1〕又は〔2〕と同義である。)

で表される化合物である、〔1〕に記載の治療剤又は予防剤；

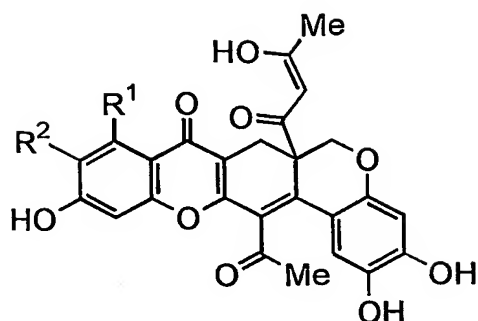
10 〔16〕 式〔1〕で表される化合物が、式〔13〕：



(式中、R¹、R²、R⁴ および R⁵ は〔1〕又は〔2〕と同義である。)

で表される化合物である、〔1〕に記載の治療剤又は予防剤；

〔17〕 式〔1〕で表される化合物が、式〔14〕：



[14]

(式中、 R^1 及び R^2 は、〔1〕と同義である。)

で表される化合物である、〔1〕に記載の治療剤又は予防剤；

〔18〕 虚血性神経障害が、網膜神経障害である、〔1〕～〔17〕のいずれ

5 か記載の治療剤又は予防剤。

〔19〕 網膜神経障害が、緑内障、糖尿病性網膜症、黄斑変性症又は未熟児網膜症である、〔18〕に記載の治療剤又は予防剤；

に関するものである。

〔20〕 虚血性神経障害が、脳塞栓症、一過性脳虚血、鎖骨下動脈盗血症候群

10 、Wallenberg症候群（延髄外側症候群）、脳血栓症、ラクナ梗塞、可逆性虚血性神経障害、脳梗塞、もやもや病（ウィリス動脈輪閉塞症）、低酸素性脳症、静脈洞血栓症、または術後脊髄虚血である、〔1〕～〔17〕のいずれか記載の治療剤又は予防剤。

15 図面の簡単な説明

図1は、外顆粒細胞層（ONL：outer nuclear layer）の厚みを測定した結果を示す図である〔Student's t-test, compared to (IOP上昇負荷+PBSを投与) Group, * : <0.05〕。IOPとはIntra Ocular Pressureの略であり眼圧を意味し、PBSとはPhosphate buffered salineの略である。横軸の番号の意味は以下のとおり。すなわち

20 、1 正常眼圧；2 眼圧（IOP）上昇負荷+ PBSを投与；3 IOP上昇負荷+ SPF-3059-1を前投与処置；4 IOP上昇負荷+ SPF-3059-1を後投与処置。図1より、眼圧上昇負荷およびSPF-3059-1の投与は共に外顆粒細胞層へは影響を及ぼさないことがわかる

。

図2は、内顆粒細胞層 (INL : inner nuclear layer) の厚みを測定した結果を示す図である [Student's t-test, compared to (IOP上昇負荷+PBSを投与) Group, * : <0.05] 。横軸の1~4は図1と同様である。図2より、眼圧上昇負荷によって薄層化するINLの厚みが、薬剤の投与により抑制されることがわかる。

図3は、内網状層 (IPL : inner plexus layer) の厚みを測定した結果を示す図である [Student's t-test, compared to (IOP上昇負荷+PBSを投与) Group, * : <0.05] 。横軸の1~4は図1と同様である。図3より、眼圧上昇負荷によって薄層化するIPLの厚みが、薬剤の投与により抑制されることがわかる。

10 図4は、0.5%クレシルバイオレットで染色した網膜切片の写真である。(1) 正常眼圧 ; (2) 眼圧 (IOP) 上昇負荷+PBSを投与 ; (3) IOP上昇負荷+SPF-3059-1を前投与処置 ; (4) IOP上昇負荷+SPF-3059-1を後投与処置。

図5は、外顆粒細胞層 (ONL : outer nuclear layer) の厚みを測定した結果を示す図である [Student's t-test, compared to (IOP上昇負荷+PBSを投与) Group, * : <0.05] 。横軸の番号の意味は以下のとおり。すなわち、1 正常眼圧 ; 2 眼圧 (IOP) 上昇負荷+ PBSを投与 ; 3 IOP上昇負荷+ SPF-3059-5を前投与処置 ; 4 IOP+ SP-3059-5を後投与処置。図5より、眼圧上昇負荷およびSPF-3059-5の投与は共に外顆粒細胞層へは影響を及ぼさないことがわかる。

20 図6は、内顆粒細胞層 (INL : inner nuclear layer) の厚みを測定した結果を示す図である [Student's t-test, compared to (IOP上昇負荷+PBSを投与) Group, * : <0.05] 。横軸の1~4は図5と同様である。図6より、眼圧上昇負荷によって薄層化するINLの厚みが、薬剤の投与により抑制されることがわかる。

図7は、内網状層 (IPL : inner plexus layer) の厚みを測定した結果を示す図である [Student's t-test, compared to (IOP上昇負荷+PBSを投与) Group, * : <0.05] 。横軸の1~4は図5と同様である。図7より、眼圧上昇負荷によって薄層化するIPLの厚みが、薬剤の投与により抑制されることがわかる。

図8は、0.5%クレシルバイオレットで染色した網膜切片の写真である。(1) 正

常眼圧；（２）眼圧（IOP）上昇負荷＋PBSを投与；（３）IOP上昇負荷＋SPF-3059-5を前投与処置；（４）IOP+SPF-3059-5を後投与処置。

発明を実施するための最良の形態

- 5 本明細書において、アルコキシカルボニル基とは、炭素数２～７の直鎖もしくは分枝のアルコキシカルボニル基を表し、具体的には、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロポキシカルボニル基、１-メチルエトキシカルボニル基、ブトキシカルボニル基、１-メチルプロポキシカルボニル基、２-メチルプロポキシカルボニル基、１,１-ジメチルエトキシカルボニル基、ペンチルオキシカルボニル基、ヘキシルオキシカルボニル基等を例示することができる。

本明細書において、アシルオキシ基とは、炭素数２～６の直鎖もしくは分枝のアシルオキシ基を表し、具体的には、アセトキシ基、プロピオニルオキシ基、ブチリルオキシ基、ピバロイルオキシ基等を例示することができる。

- 15 ペニシリウム・エスピー（*Penicillium* SP.）SPF-3059株を培養することにより得られるセマフォリン阻害活性を有する化合物であって、式〔１〕で表される化合物としては、国際公開第02/09756号パンフレット又は国際公開第03/062243号パンフレットに開示された一連のセマフォリン阻害活性を有する化合物を挙げることができる。また、該化合物の誘導体としては、国際公開第03/062440号パンフレットに開示された一連のキサントン誘導体を例示することができる。

- 20 式〔１〕において、 R^7 及び R^8 における有機基としては特に限定は無く、 R^7 及び R^8 は結合して飽和もしくは不飽和の環構造を形成していてもよい。

- 式〔１〕、〔２〕、〔３〕、〔４〕および〔６〕で表される化合物において、 R^1 は、水素原子、カルボキシ基又はアルコキシカルボニル基を表す。また、前記アルコキシカルボニル基としてはメトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロポキシカルボニル基等の炭素数２～４のアルコキシカルボニル基を挙げることができ、中でもメトキシカルボニル基が好ましい。特に、式〔２〕、〔３〕及び〔６〕における R^1 は、好ましくは水素原子又はカルボキシ基を表し、式〔４〕におけ

る R^1 は、好ましくは水素原子、カルボキシ基又はメトキシカルボニル基、更に好ましくは水素原子又はカルボキシ基を表す。

また、式[1]、[2]、[3]、[4]及び[6]において、 R^2 は、水素原子、水酸基又はアシルオキシ基、好ましくは水素原子又は水酸基を表す。また、前記アシルオキシ基としては、アセトキシ基、プロピオニルオキシ基、ピバロイルオキシ基等を挙げることができる。

また、式[4]において、 R^3 は、水素原子、メトキシメチル基又は前記式[15]に示される基を表す。

式[15]において、 R^6 は水素原子、カルボキシ基又はアルコキシカルボニル基を表す。また、前記アルコキシカルボニル基としてはメトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロポキシカルボニル基等を挙げることができ、中でもメトキシカルボニル基が好ましい。 R^6 は好ましくは水素原子又はカルボキシ基を表す。

また、式[16]、[17]、[18]、[2]、[3]、[4]、[5]及び[6]において、 R^4 は、水素原子、カルボキシ基又はアルコキシカルボニル基を表す。また、前記アルコキシカルボニル基としてはメトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロポキシカルボニル基等を挙げることができ、中でもメトキシカルボニル基が好ましい。 R^4 は好ましくは水素原子又はカルボキシ基を表す。

また、式[16]、[17]、[18]、[2]、[3]、[4]、[5]及び[6]において、 R^5 は、水素原子、水酸基又はアシルオキシ基を表す。また、前記アシルオキシ基としては、アセトキシ基、プロピオニルオキシ基、ピバロイルオキシ基等を挙げることができる。 R^5 は好ましくは水素原子又は水酸基を表す。

式[7]～[10]、[12]～[13]において、 R^1 および R^4 は独立して、水素原子、カルボキシ基又はアルコキシカルボニル基を表す。また、前記アルコキシカルボニル基としてはメトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロポキシカルボニル基等を挙げることができ、中でもメトキシカルボニル基が好ましい。 R^1 および R^4 は好ましくは水素原子又はカルボキシ基を表す。一方 R^2 および

R⁵ は独立して水素原子、水酸基又はアシルオキシ基を表す。また、前記アシルオキシ基としては、アセトキシ基、プロピオニルオキシ基、ピバロイルオキシ基等を挙げることができる。R² およびR⁵ は好ましくは水素原子又は水酸基を表す。

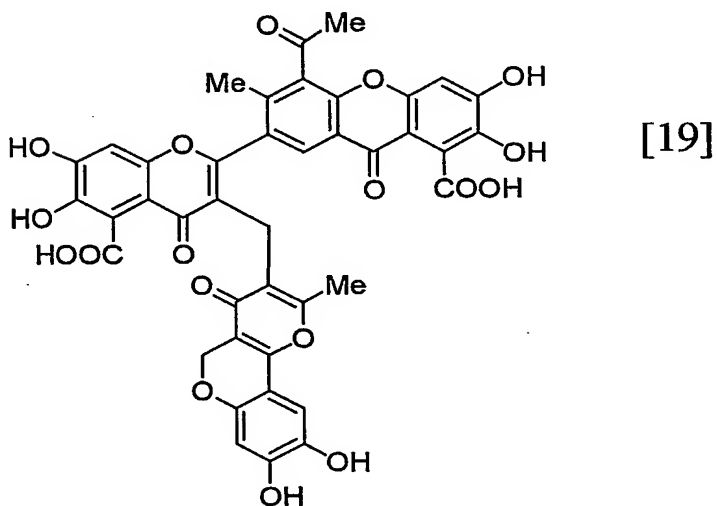
式 [11] 及び [14] において、R¹ は、水素原子、カルボキシ基又はアルコキシカルボニル基を表す。また、前記アルコキシカルボニル基としてはメトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロポキシカルボニル基等を挙げることができる、中でもメトキシカルボニル基が好ましい。R¹ は好ましくは水素原子又はカルボキシ基を表す。一方、R² は、水素原子、水酸基又はアシルオキシ基を表す。また、前記アシルオキシ基としては、アセトキシ基、プロピオニルオキシ基、ピバロイルオキシ基等を挙げることができる。R² は好ましくは水素原子又は水酸基を表す。

式 [2] で表される化合物として、具体的にはR¹ 及びR⁴ がカルボキシ基を表し、R² 及びR⁵ が水酸基を表すSPF-3059-1；R¹ がカルボキシ基を表し、R⁴ が水素原子を表し、R² 及びR⁵ が水酸基を表すSPF-3059-3；R¹ 及びR⁴ がカルボキシ基を表し、R² が水酸基を表し、R⁵ が水素原子を表すSPF-3059-7；R¹ が水素原子を表し、R⁴ がカルボキシ基を表し、R² 及びR⁵ が水酸基を表すSPF-3059-9；又は、R¹ 及びR⁴ が水素原子を表し、R² 及びR⁵ が水酸基を表すSPF-3059-30が挙げられる。

式 [3] で表される化合物として、具体的にはR¹ がカルボキシ基を表し、R⁴ が水素原子を表し、R² 及びR⁵ が水酸基を表すSPF-3059-2；R¹ 及びR⁴ がカルボキシ基を表し、R² 及びR⁵ が水酸基を表すSPF-3059-5；R¹ 及びR⁴ がカルボキシ基を表し、R² が水酸基を表し、R⁵ が水素原子を表すSPF-3059-4；R¹ 及びR⁴ がカルボキシ基を表し、R² が水素原子を表し、R⁵ が水酸基を表すSPF-3059-12；R¹ が水素原子を表し、R⁴ がカルボキシ基を表し、R² 及びR⁵ が水酸基を表すSPF-3059-24；R¹ が水素原子を表し、R⁴ がカルボキシ基を表し、R² が水酸基を表し、R⁵ が水素原子を表すSPF-3059-25；又は、R¹ 及びR⁴ が水素原子を表し、R²

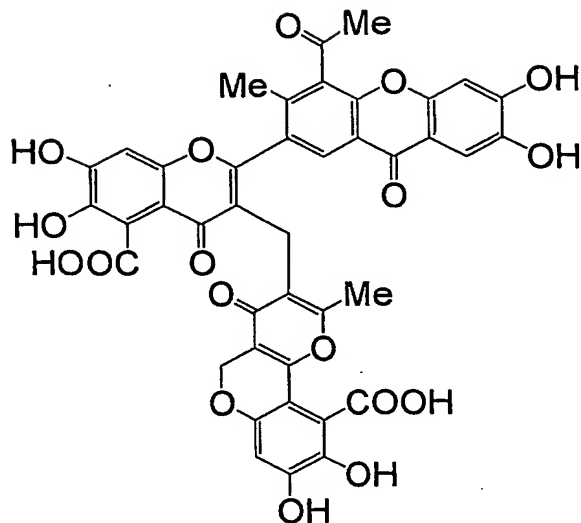
及びR⁵が水酸基を表すSPF-3059-26が挙げられる。

式[4]で表される化合物として、具体的には、R¹及びR⁴がカルボキシ基を表し、R²及びR⁵が水酸基を表し、R³がメトキシメチル基を表す、SPF-3059-6；R¹及びR⁴がカルボキシ基を表し、R²及びR³が水素原子を表し、R⁵が水酸基を表すSPF-3059-28；R¹がカルボキシ基を表し、R⁴が水素原子を表し、R²及びR⁵が水酸基を表し、R³がメトキシメチル基を表す、SPF-3059-29；R¹がメトキシカルボニル基を表し、R⁴がカルボキシ基を表し、R²及びR³が水素原子を表し、R⁵が水酸基を表す、SPF-3059-35；以下の式[19]：



10

で表されるSPF-3059-37；R¹及びR⁴がカルボキシ基を表し、R²及びR⁵が水酸基を表し、R³が水素原子を表す、SPF-3059-39；又は以下式[20]：



[20]

で表される SPF-3059-42 が挙げられる。

式 [5] で表される化合物として、具体的には、 R^4 がカルボキシ基を表し、 R^5 が水酸基を表す、SPF-3059-27；又は、 R^4 が水素原子を表し、 R^5 が水酸基を表す、SPF-3059-36 が挙げられる。

式 [6] で表される化合物として、具体的には、 R^1 が水素原子を表し、 R^4 がカルボキシ基を表し、 R^2 及び R^5 が水酸基を表す、SPF-3059-34 が挙げられる。

式 [7] で表される化合物として、具体的には、 R^1 及び R^4 がカルボキシ基を表し、 R^2 及び R^5 が水酸基を表す、SPF-3059-8；又は、 R^1 及び R^4 がカルボキシ基を表し、 R^2 が水素原子を表し、 R^5 が水酸基を表す、SPF-3059-20 が挙げられる。

式 [8] で表される化合物として、具体的には、 R^1 及び R^4 がカルボキシ基を表し、 R^2 及び R^5 が水酸基を表す、SPF-3059-16 が挙げられる。

式 [9] で表される化合物として、具体的には、 R^1 及び R^4 がカルボキシ基を表し、 R^2 及び R^5 が水酸基を表す、SPF-3059-17 が挙げられる。

式 [10] で表される化合物として、具体的には、 R^1 及び R^4 がカルボキシ基を表し、 R^2 及び R^5 が水酸基を表す、SPF-3059-19 が挙げられる。

式 [11] で表される化合物として、具体的には、 R^1 がカルボキシ基を表し、

R² が水酸基を表す、SPF-3059-22が挙げられる。

式[12]で表される化合物として、具体的には、R¹及びR⁴がカルボキシ基を表し、R²及びR⁵が水酸基を表す、SPF-3059-38が挙げられる。

式[13]で表される化合物として、具体的には、R¹及びR⁴がカルボキシ基を表し、R²及びR⁵が水酸基を表す、SPF-3059-23が挙げられる。

式[14]で表される化合物として、具体的には、R¹がカルボキシ基を表し、R²が水酸基を表す、SPF-3059-40が挙げられる。

上記の式[1]～[14]で表される化合物は、ペニシリウム・エスピー (Penicillium sp.) SPF-3059株の培養物からセマフォリン阻害活性を指標として得ることができる。また、このようにして得られたセマフォリン阻害活性を有する化合物等から公知の転換方法や公知の合成方法により製造した化合物からセマフォリン阻害活性を指標として同定することができる。

また、式[1]～[14]で表される化合物においては、それらの塩やそれらの誘導体、好ましくは医薬的又は獣医薬的に許容される塩や誘導体も本発明の範疇に含まれる。ここで、塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、アルミニウム塩、アンモニウム塩等の無機塩基塩や、トリエチルアンモニウム塩、トリエタノールアンモニウム塩、ピリジニウム塩、ジイソプロピルアンモニウム塩等の有機塩基塩や、アルギニン、リジン等の塩基性アミノ酸塩などを挙げることもできる。また誘導体としては、化合物のカルボキシ基や水酸基がエステル基に変換された誘導体が挙げられ、例えば水酸基がアセチル基、プロピオニル基などの炭素数2～5のアシル基でアシル化された誘導体や、カルボキシ基がメチルエステル、エチルエステルなどの炭素数2から5のエステルへ変換された誘導体等を挙げることもできる。前記誘導体は、例えば国際公開第03/062440号パンフレットに記載された方法を参照すればよい。

前記式[1]～[14]で表される化合物は、いずれも大阪府内土壌より分離したペニシリウム属に属するカビSPF-3059株〔本菌株は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に基づき、2001年7月13日に

経済産業省独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6）に受託番号FERM BP-7663として寄託されている。]を培養することにより効果的に得ることができ、国際公開第02/09756号パンフレット又は国際公開第03/062243号パンフレットに記載された方法に従って得ることができる。

セマフォリン阻害活性を有する本発明の化合物は、虚血性障害による神経細胞死の抑制作用を示したことから、虚血性神経疾患治療剤又は予防剤として使用しうる。ここでいう虚血性神経疾患としては、虚血による網膜神経障害または虚血性脳血管障害が挙げられる。ここでいう網膜神経障害としては、例えば緑内障、網膜中心動脈閉塞症、網膜中心動脈分枝閉塞症、網膜中心静脈閉塞症、網膜中心静脈分枝閉塞症、虚血性視神経症、糖尿病性網膜症、黄斑変性症、未熟児網膜症等が挙げられ、中でも糖尿病性網膜症が好ましい。また虚血性脳血管障害としては、例えば、脳塞栓症、一過性脳虚血、鎖骨下動脈盗血症候群、Wallenberg症候群（延髄外側症候群）、脳血栓症、ラクナ梗塞、可逆性虚血性神経障害、脳梗塞、もやもや病（ウィリス動脈輪閉塞症）、低酸素性脳症、静脈洞血栓症、または術後脊髄虚血などが挙げられる。本発明の化合物は網膜神経保護作用を有しており、特に、虚血による網膜神経障害の治療又は予防に有効である。

本発明の虚血性神経障害治療剤又は予防剤は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。またこれら治療剤又は予防剤は、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち経口的には、通常用いられる投与形態、例えば錠剤、丸剤、粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、乳剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができる。

非経口的には、例えば、静脈内注射（点滴剤）、筋注射剤、皮下注射剤、点眼剤、眼軟膏剤等の形態の製剤とすることができる。

錠剤のような固体制剤は有効成分を乳糖、ショ糖、トウモロコシ澱粉などの通常の薬理的に許容しうる担体または賦形剤、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビ

ニルピロリドン、ヒドロキシプルピルメチルセルロースなどの結合剤、カルボキシメチルセルロースナトリウムや澱粉グリコール酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸やステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、あるいは保存剤等と混合して調製される。

- 5 非経口投与には、有効成分は水、生理食塩水、油、ブドウ糖水溶液などの生理的に許容しうる担体に溶解または懸濁し、これは補助剤として乳化剤、安定化剤、浸透圧調整用塩または緩衝剤を必要に応じて含有してもよい。点眼剤の添加物として、グリセリンや塩化ナトリウムなどの等張化剤、リン酸やクエン酸などの緩衝剤、塩酸や水酸化ナトリウムなどのpH調節剤、ヒドロキシプルピルメチルセルロース
- 10 やポリビニルアルコールなどの増粘剤、塩化ベンゼトニウムなどの保存剤、あるいは可溶化剤を必要に応じて含有してもよい。また、眼軟膏剤の添加剤としては、ワセリン、ポリエチレングリコール、精製ラノリン、流動パラフィン等が例示される。

- 投与量及び投与回数は、投与法と患者の年齢、体重、病状等によって異なるが、
- 15 病床部位に局所的に投与する方法が好ましい。また、1日あたり1回又は2回以上投与することが好ましい。2回以上投与するときは連日あるいは適当な間隔をおいて繰り返し投与することが望ましい。

- 投与量は成人患者一人一回当たり有効成分の量として数百 μg ～2g、好ましくは5～百mg、更に好ましくは数十mg以下を用いることができ、一日一回または
- 20 数回にわけて投与することができる。非経口投与では、成人患者一人あたり0.1～100mg/日、さらに好ましくは0.3～50mg/日の投与量が挙げられ、一日一回または数回に分けて投与することができる。投与回数を減らすために徐放性製剤を用いることもできる。点眼剤として用いる場合には、有効成分の量として、成人患者一人あたり0.01～10w/v%、好ましくは0.05～5w/v%
- 25 を用いることができ、症状に応じて1回量1～数滴を1日1～6回投与することが望ましい。また、眼軟膏剤として用いる場合には、有効成分の量として、0.01～10w/w%、好ましくは0.1～5w/w%を用いることができ、症状に応じ

て1日1～6回投与することが望ましい。

また、本発明の虚血性神経障害治療剤又は予防剤は、動物薬としての利用も可能である。

5 実施例

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例 1

10 眼圧上昇モデルに対する薬理効果

網膜神経は、網膜外顆粒層、網膜内顆粒細胞および神経節細胞層から構成されており、網膜内顆粒細胞および神経節細胞層は網膜中心動脈から、血液の供給を受けている。前房に圧力をかけると強膜に被われていない篩状板に負荷がかかり、この領域を通過して伸展する網膜中心動脈は閉塞され、その結果、網膜内顆粒細胞および神経節細胞層が虚血状態となり、細胞死を起こす。

網膜内顆粒細胞の障害は、細胞数の変化を「内顆粒細胞層 (INL: inner nuclear layer) の厚さ」として容易に評価できる。また、眼圧上昇によって各神経細胞間のシナプスである内網状層も障害を受け薄層化することから、内網状層 (IPL: inner plexus layer) の厚さも障害の程度を知る指標となる。この2つのパラメーターを指標として抑制効果を有する網膜神経障害治療剤又は予防剤を探索した。

[試験方法]

(1) 実験動物

SD系ラット 6 週齢を20匹使用し、以下の群分けを行った。

Shamオペレーション (以下Sham opeと略する場合がある。) 5匹 (うち解析 4 例)

IOP (Intra Ocular pressure) 処置+PBS (5 μ l硝子体内投与) 5匹 (うち解析 4 例)

IOP (Intra Ocular pressure) 処置+被験物質 (5 μ l 硝子体内前投与) 5匹 (うち解析4例)

IOP (Intra Ocular pressure) 処置+被験物質 (5 μ l 硝子体内後投与) 5匹 (うち解析4例)

5 (2) 眼圧上昇

以下の工程で、眼圧上昇モデル動物を作成し、薬剤(評価化合物)の投与を行った。

(i) ラットを50mg/kg, i. p. 投与麻酔下で、脳固定装置に固定した。

10 (ii) ラットの頭部を固定し、眼球に血圧測定装置をつないだチューブの先に26 Gの針を装着し、ラット前房室内に刺入し、前房室内圧140~160mmHgの圧で負荷をかけた。

(iii) 薬剤の硝子体内投与のタイミングに関しては、前投与処置の場合は眼圧上昇負荷の15分前に投薬を行い、後投与処置の場合は眼圧上昇負荷15分後に投薬を行った。

15 (iv) 1時間眼圧上昇を維持し、眼圧負荷後ラットを脳固定装置から解除し、1週間通常飼育を行った。

(v) 炭酸ガスによる窒息死後、眼球を摘出した。

(vi) パラフィン網膜切片を作成し、0.5%クレシルバイオレットで染色した。

20 (vii) 視神経乳頭より880 μ mの位置(網膜上方)の組織像を撮影し、外顆粒細胞層(ONL: outer nuclear layer)、内顆粒細胞層(INL: inner nuclear layer)、内網状層(IPL: inner plexus layer)の厚さを測定した。

(3) 薬剤の調整および投与方法

被験物質としてSPF-3059-1をPBSに1mg/mlの濃度で溶解し、使用直前にPBSで更に0.1mg/mlに希釈した。希釈した溶液、5 μ lを30G二重針にて、ラット左眼硝子体内に
25 投与した。

(4) 有意差検定

上記(2)の方法で眼圧上昇を施行し、PBSを硝子体内投与したラットに対して、

SPF-3059-1投与による網膜保護効果をStudent's t-testおよびWelch&F-testにて有意差検定を行った。

[薬理評価]

- 5 各処置群のラット網膜を用いて、外顆粒細胞層、内顆粒細胞層、内網状層それぞれの層の厚さを測定し、細胞保護効果を評価した。以下、表1及び図1〔外顆粒細胞層 (ONL: outer nuclear layer)〕、表2及び図2〔内顆粒細胞層 (INL)〕、表3及び図3〔内網状層 (IPL)〕に、測定値を示した。また、図4に0.5%クレシルバイオレットで染色した網膜切片を示した。

表1

	平均 (μm)	SD	SE
Sham ope	45.65	2.73	1.37
IOP上昇負荷+PBS投与	45.47	4.16	2.08
IOP上昇負荷+被験物質前投与	45.79	5.67	2.83
IOP上昇負荷+被験物質後投与	45.56	0.13	0.06

10 表2

	平均 (μm)	SD	SE
Sham ope	33.41	3.71	1.86
IOP上昇負荷+PBS投与	22.37	2.08	1.04
IOP上昇負荷+被験物質前投与	29.56	4.13	2.06
IOP上昇負荷+被験物質後投与	27.89	7.81	3.91

表3

	平均 (μm)	SD	SE
Sham ope	54.86	8.53	4.26
IOP上昇負荷+PBS投与	26.03	6.88	3.44
IOP上昇負荷+被験物質前投与	46.89	11.50	5.75
IOP上昇負荷+被験物質後投与	40.45	20.39	10.19

- 外顆粒細胞は脈絡層からの血液供給を受けており、眼圧上昇による眼動脈虚血障害を受けないことがわかっているが、表1及び図1の結果より、本実施例でも外顆粒細胞層の厚さは、眼圧上昇による影響を受けないことが示された。以上のことから、本実験で作成した切片は適切に作成されていることが確認できる。

内顆粒細胞は眼動脈からの血液供給を受けており、眼圧上昇によって眼動脈虚血

障害を受け、遅発性の細胞死を引き起こすことがわかっている。表2及び図2の結果から、本実施例により、眼圧上昇によって内顆粒細胞が細胞死を引き起こし、同細胞の存在する細胞層の薄層化が観察された。さらにSPF-3059-1の前投与によって内顆粒細胞死が抑制され、同細胞層の薄層化が有意に抑制されることが示された。またSPF-3059-1の後投与によって、統計学的な有意差は認められなかったものの、薄層化の抑制傾向が観察され、内顆粒細胞死に対する細胞死抑制効果が考察された。

更に、内網状層は、内顆粒細胞と神経節細胞間のシナプス形成がなされている層であり、細胞体から進展している軸索のみが存在する層である。内顆粒細胞が眼圧上昇による眼動脈虚血障害を受けることから、その軸索である内網状が退縮し、内網状層の薄層化が起こることが知られている。本実施例によってもこの現象が再現され、眼圧上昇による内網状層の薄層化が観察された。さらにSPF-3059-1の前投与によって内顆粒細胞死が抑制され、内網状層の薄層化が有意に抑制されることが示された。またSPF-3059-1の後投与によって、統計学的な有意差は認められなかったものの、薄層化の抑制傾向が観察され、内顆粒細胞死に対する細胞死抑制効果が考察された。

以上の結果、SPF-3059-1は眼圧上昇による内顆粒細胞の細胞死を抑制することが示された。また内網状層は、内顆粒細胞および神経節細胞両者のシナプス形成の場であり、神経節細胞の軸索も含まれていることから、神経節細胞への保護効果も考えられた。

また、SPF-3059-1の前投与処置では、内顆粒細胞層および内網状層の薄層化に対して統計学的に有意に抑制作用を有していることが示された。更に、内顆粒細胞層および内網状層の薄層化に対して、SPF-3059-1の後投与処置を行うことによっても、抑制傾向を示すことがわかった。

上記の結果から、眼疾患において、内顆粒細胞の虚血性障害が疑われる糖尿病性網膜症、神経節細胞の障害が報告される緑内障等に対し、SPF-3059-1が有効であることがわかった。

実施例 2

眼圧上昇モデルに対する薬理効果

[試験方法]

5 (1) 実験動物

SD系ラット 7 週齢を 20 匹使用し、以下の群分けを行った。

Sham オペレーション 4 例

IOP (Intra Ocular pressure) 処置+PBS (5 μ l 硝子体内投与) 4 例

IOP (Intra Ocular pressure) 処置+被験物質 (5 μ l 硝子体内前投与) 4 例

10 IOP (Intra Ocular pressure) 処置+被験物質 (5 μ l 硝子体内後投与) 4 例

(2) 眼圧上昇

実施例 1 と同様の工程で、眼圧上昇モデル動物を作成し、薬剤(評価化合物)の投与を行った。

(3) 薬剤の調整および投与方法

15 被験物質として SPF-3059-5 を使用直前に PBS で 0.1 mg/ml に希釈した。希釈した溶液、5 μ l を 30G 二重針にて、ラット左眼硝子体内に投与した。

(4) 有意差検定

上記 (2) の方法で眼圧上昇を施行し、PBS を硝子体内投与したラットに対して、SPF-3059-5 投与による網膜保護効果を Student's t-test および Welch & F-test にて有意差検定を行った。

[薬理評価]

各処置群のラット網膜を用いて、外顆粒細胞層、内顆粒細胞層、内網状層それぞれの層の厚さを測定し、細胞保護効果を評価した。以下、表 4 及び図 5 [外顆粒細胞層 (ONL: outer nuclear layer)]、表 5 及び図 6 [内網状層 (IPL) 内顆粒細胞層 (INL)]、表 6 及び図 7 [内顆粒細胞層 (INL) 内網状層 (IPL)] に、測定値を示した。また、図 8 に 0.5% クレシルバイオレットで染色した網膜切片を示した。

表 4

	平均 (μm)	SD	SE
Sham ope	61.76	3.40	1.70
IOP上昇負荷+PBS投与	61.03	4.41	2.21
IOP上昇負荷+被験物質前投与	60.29	3.80	1.90
IOP上昇負荷+被験物質後投与	61.76	4.16	2.08

表 5

	平均 (μm)	SD	SE
Sham ope	36.76	5.63	2.82
IOP上昇負荷+PBS投与	27.21	2.82	1.41
IOP上昇負荷+被験物質前投与	33.09	2.82	1.41
IOP上昇負荷+被験物質後投与	36.76	1.70	0.85

表 6

	平均 (μm)	SD	SE
Sham ope	58.09	5.02	2.51
IOP上昇負荷+PBS投与	38.24	7.20	3.60
IOP上昇負荷+被験物質前投与	55.88	7.20	3.60
IOP上昇負荷+被験物質後投与	55.15	6.52	3.26

外顆粒細胞は脈絡層からの血液供給を受けており、眼圧上昇による眼動脈虚血障
 5 害を受けないことがわかっているが、表 4 及び図 5 の結果より、本実施例でも外顆
 粒細胞層の厚さは、眼圧上昇による影響を受けないことが示された。以上のことか
 ら、本実験で作成した切片は適切に作成されていることが確認できる。

内顆粒細胞は眼動脈からの血液供給を受けており、眼圧上昇によって眼動脈虚血
 障害を受け、遅発性の細胞死を引き起こすことがわかっている。表 5 及び図 6 の結
 10 果から、本実施例により、眼圧上昇によって内顆粒細胞が細胞死を引き起こし、同
 細胞の存在する細胞層の薄層化が観察された。さらに SPF-3059-5 の前投
 与によって、統計学的な有意差は認められなかったものの、薄層化の抑制傾向が観
 察され、内顆粒細胞死に対する細胞死抑制効果が考察された。また SPF-305
 9-5 の後投与によって、統計学的な有意差をもって、内顆粒細胞死に対する細胞
 15 死抑制効果が示された。

更に、内網状層は、内顆粒細胞と神経節細胞間のシナプス形成がなされている層

であり、細胞体から進展している軸索のみが存在する層である。内顆粒細胞が眼圧上昇による眼動脈虚血障害を受けることから、その軸索である内網状が退縮し、内網状層の薄層化が起こることが知られている。表6及び図7の結果から、本実施例によってもこの現象が再現され、眼圧上昇による内網状層の薄層化が観察された。

- 5 さらにSPF-3059-5の前投与並びに後投与によって、内網状層の薄層化が有意に抑制されることが示され、網膜内の神経機能を保護していることが考察された。

- 10 以上の結果、SPF-3059-5は眼圧上昇による内顆粒細胞の細胞死を抑制することが示された。また内網状層は、内顆粒細胞および神経節細胞両者のシナプス形成の場であり、神経節細胞の軸索も含まれていることから、神経節細胞への保護効果も考えられた。

- また、SPF-3059-5の前投与処置では、内顆粒細胞層に対して抑制傾向を示し、内網状層の薄層化に対しては統計学的に有意に抑制作用を示すことがわかった。更に、SPF-3059-5の後投与処置を行うことによっても、内顆粒細胞層および内網状層の薄層化に対して、統計学的に有意に抑制作用を有していることが示された。

上記の結果から、眼疾患において、内顆粒細胞の虚血性障害が疑われる糖尿病性網膜症、神経節細胞の障害が報告される緑内障等に対し、SPF-3059-5が有効であることがわかった。

20 実施例3

化合物の製造

- 25 本発明の化合物は、いずれも公知化合物であり、国際公開第02/09756号パンフレット又は国際公開第03/062243号パンフレットに開示されており、いずれもペニシリニウム属カビであるSPF-3059株から製造することができる。製造方法及び物理化学的性質についても前記国際公開パンフレットに記載されている。具体的には以下の化合物をそれぞれ調製した。

(化合物SPF-3059-1)

性状：黄色粉末

高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z (M+H)⁺

:

実測値：579.0772

5 計算値：579.0776

分子式：C₂₈H₁₈O₁₄

紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ϵ) :

241(31,600)、315(23,400)、365(16,500)

赤外吸収スペクトル ν_{max} (KBr) cm⁻¹ :

10 3400、1701、1615、1570、1457、1273

¹H-NMR (500MHz、DMSO-d₆) δ ppm :

2.28、2.67、2.69、4.6~4.7、5.02、6.40、6.91、7.91、8.52、9.33、

11.1~11.6、12.8

¹³C-NMR (125MHz、DMSO-d₆) δ ppm :

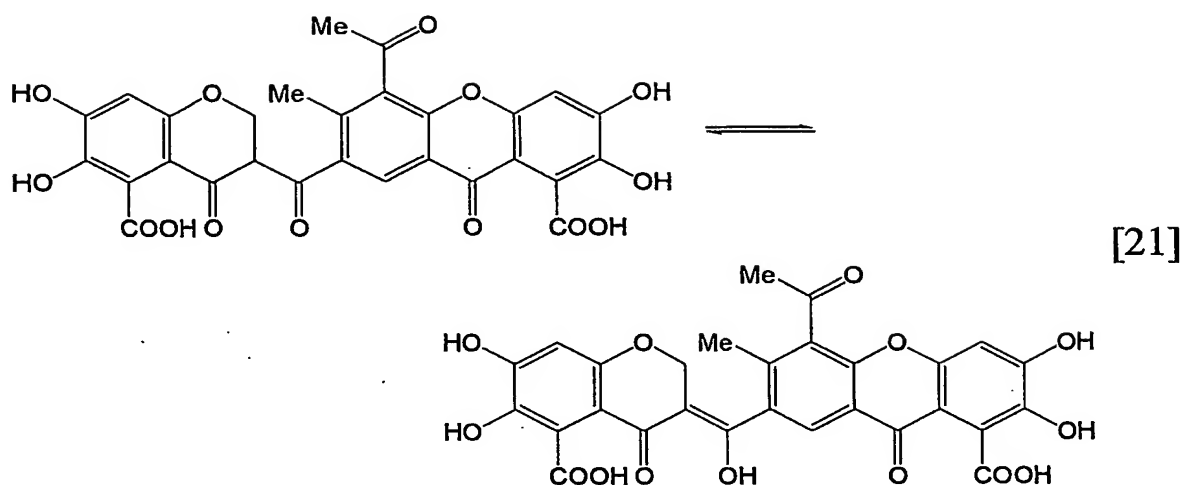
15 16.5、17.0、32.4、56.2、65.7、68.0、102.3、104.2、108.8、110.1、

118.2、118.5、120.6、122.2、125.8、127.7、132.4、134.9、137.6、139.1

、
140.7、140.8、150.1、150.2、152.2、153.8、154.5、156.3、167.5、167.6

20 172.7、172.8、186.3、199.1、202.7、202.9

31



(互変異性体)

(化合物SPF-3059-5)

性状：クリーム色粉末

5 高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z ($M+H$)⁺

:

実測値：577.0615

計算値：577.0619

分子式：C₂₈H₁₆O₁₄10 紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ϵ) :

229(35,800)、284(22,600)、322(21,000)

赤外吸収スペクトル ν_{max} (KBr) cm⁻¹ :

3260、1684、1626、1567、1467、1288

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm :

15 2.53(3H, s)、2.55(3H, s)、6.93(1H, s)、6.96(1H, s)、8.17(1H, s)、

8.53(1H, s)、9.5~13.0(6H)

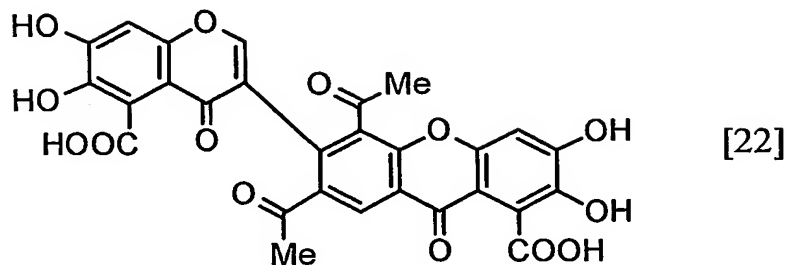
¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ ppm :

29.1、32.1、102.26、102.32、109.9、112.4、119.6、119.8、120.3、120.9

20 126.3、132.5、133.4、136.2、141.2、141.7、150.4、150.8、152.1、152.6

8、

152.73、154.5、167.4、167.5、172.5、172.9、199.1、201.1



(SPF-3059-24)

5 外観：クリーム色粉末

分子量：532

分子式： $C_{27}H_{16}O_{12}$ 高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (positive) : 533 ($M+H$)⁺10 高速電子衝撃質量スペクトル (FAB-MS) m/z (negative) : 531 ($M-H$)⁻高分解能高速電子衝撃質量スペクトル (HRFAB-MS) m/z ($M+H$)⁺ :

実測値：531.0621

計算値：531.0564 ($C_{27}H_{17}O_{12}$)15 紫外可視吸収スペクトル λ_{max} (メタノール中) nm (ϵ) :

212(36,900)、229sh(34,500)、283(26,300)、323(21,700)

赤外吸収スペクトル ν_{max} (KBr) cm^{-1} :

3447、1697、1629、1578、1470、1290

¹H-NMR (DMSO- d_6) δ ppm :

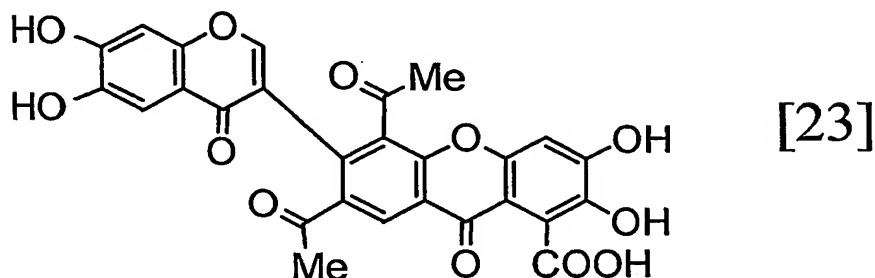
20 2.52(3H, s)、2.54(3H, s)、6.92(1H, s)、6.93(1H, s)、7.28(1H, s)、8.13(1H, s)、8.54(1H, s)、9.50~13.00(5H, brs)

¹³C-NMR (DMSO- d_6) δ ppm :

29.1、32.3、102.3、102.9、107.9、110.0、115.8、119.8、120.4、120.7、12

6.5、133.0、133.3、136.0、141.2、145.0、150.4、151.1、152.2、152.9、153.0
、154.3、167.5、172.6、173.6、199.1、201.1

溶解性：水、ヘキサンに不溶、メタノール、DMSOに可溶



5 国際公開第02/09756号パンフレット中の実施例1並びに14に記載された方法で、
化合物SPF-3059-2、SPF-3059-12、SPF-3059-4、
SPF-3059-25、SPF-3059-34、SPF-3059-6、SP
F-3059-27、SPF-3059-26、SPF-3059-28、SPF
-3059-7、SPF-3059-39、SPF-3059-37、SPF-3
10 059-3、SPF-3059-35、SPF-3059-9、SPF-3059
-29、SPF-3059-36、SPF-3059-30を調製した。

また、国際公開第03/062243号パンフレット中の実施例1と同様の方法で、SPF
-3059-8、SPF-3059-16、SPF-3059-17、SPF-3
059-19、SPF-3059-20、SPF-3059-22、SPF-30
15 59-23、SPF-3059-38、SPF-3059-40、SPF-305
9-42を調製した。

実施例4

製剤例

20 100ml中、以下の組成物を滅菌精製水中に懸濁し、涙液と等張となる濃度で
pH 7.0に調製することにより、点眼剤を調製することができる。

SPF-3059-1 50mg

リン酸二水素カリウム 適量

34

リン酸水素二ナトリウム	適量
食塩	適量
塩化ベンゼトニウム	10mg
滅菌精製水	適量

5

実施例 5

製剤例

100ml 中、以下の組成物を滅菌精製水中に懸濁し、涙液と等張となる濃度で pH7.0 に調製することにより、点眼剤を調製することができる。

10	SPF-3059-5	50mg
	リン酸二水素カリウム	適量
	リン酸水素二ナトリウム	適量
	食塩	適量
	塩化ベンゼトニウム	10mg
15	滅菌精製水	適量

実施例 6

製剤例

眼軟膏剤常法に従い、次の処方で眼軟膏剤を調整することができる。

20	SPF-3059-1	50mg
	流動パラフィン	10g
	白色ワセリン	適量

実施例 7

25 製剤例

眼軟膏剤常法に従い、次の処方で眼軟膏剤を調整することができる。

SPF-3059-5	50mg
------------	------

流動パラフィン	10 g
白色ワセリン	適量

実施例 8

5 ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける薬理試験例

脳神経細胞の障害は、永久中大脳動脈閉塞または中大脳動脈閉塞一再開通によって生じる脳梗塞巣の大きさとして評価できる、また脳梗塞巣に存在する神経線維の数、再生神経線維の数、あるいは健常部より梗塞部へと進入する線維の数についても定量化でき、障害の程度を知る指標となる。これらのパラメーターを指標として

10 抑制効果を有する虚血性脳血管障害治療剤または予防剤の薬理作用を確認できる。

[試験方法]

(1) 薬剤投与

被験物質としてSPF-3059-1またはSPF-3059-5を、ミニ浸透圧ポンプ (Alza) にて、脳梗塞部へ直接投与する。被験物質は0.1mg/mlにPBSにて希
15 釈し、ポンプのリザーバーへ充填する。対照はPBSを充填する。ポンプは手術2日前より37℃の生理食塩水内にインキュベートし、動作を安定させる。

(2) 手術

被験物質の薬効は、脳卒中易発症ラット (SHRSPラット) を使った永久中大脳動脈閉塞モデル、およびWistarラットを使った中大脳動脈閉塞一再開通モデルにて評価
20 する。いずれも被験物質投与のための大脳皮質実質へのカニューレ埋め込み手術後に行う。

カニューレ埋め込み手術

(i) ラットをハロセン麻酔し、脳定位固定器に固定する。

(ii) 頭部皮膚を切開し、頭蓋骨を露出する。

25 (iii) ドリルにて左頭蓋骨に穴を開け、左大脳皮質実質内に薬剤を充填したミニ浸透圧ポンプに接続したカニューレを刺入する。

(iv) カニューレを歯科用セメントにて頭蓋に固定、ポンプを背側皮下に挿入する。

創部を縫合する。

永久中大脳動脈閉塞モデル

SHRSPラットに対し、以下の方法で永久中大脳動脈閉塞を作成する。

- (i) 左側頭部の筋肉を除去、ドリルにて側頭骨に穴をあけ、中大脳動脈を露出する。
- 5 (ii) 中大脳動脈を bipolar coagulator (両極性焼灼器) にて焼灼し、血液を途絶させる。
- (iii) ラットの創部を縫合し、体温を維持しつつ回復させる。

中大脳動脈閉塞一再開通モデル

Wistar ラットに対し、以下の方法で永久中大脳動脈閉塞一再開通を作成する。

- 10 (i) 頸部皮膚を切開し、頸動脈を露出する。
- (ii) 外頸動脈を絹糸で結紮する。
- (iii) 外頸動脈と内頸動脈を結ぶ細い血管を焼灼切断する。総頸動脈を結紮する。
- (iv) 内頸動脈の血流を一時的に途絶させ、外頸動脈との分岐部に穴を開け、栓子（ナイロン糸にシリコンを塗ったもの）を挿入する。
- 15 (v) 翼状口蓋動脈に栓子が行かないように注意しつつ、さらに奥へ挿入する。
- (vi) 栓子を血管と結紮し固定する。
- (vii) 創部を縫合し、体温を維持しつつ回復させる。

(3) 組織学的評価

- 薬効評価としてTTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chlorideの略) 染色による梗塞巣の大きさの測定および、免疫染色による脳梗塞巣に存在する神経線維の数、再生神経線維の数を測定する。
- 20

TTC染色による評価

- (i) 手術1週間後にラットは麻酔下で経心的に生理食塩水にて灌流を行う。
- (ii) 脳を摘出し、ブレインスライサーにて2 mm厚の切片を作成、カバーガラスに瞬間接着剤にて貼り付ける。
- 25 (iii) カバーガラスに貼り付けた切片を0.8% TTC/PBS溶液に37℃で10分間浸し染色を行う。

(iv) 4°Cの10% ホルマリン緩衝液中に移し、染色を停止する。

(v) 実体顕微鏡写真を撮影、コンピューターにてデジタルファイル化し、画像解析ソフトにて脳梗塞巣の大きさを測定する。

免疫染色による評価

- 5 (i) 手術1週間後にラットは麻酔下で経心的にPBSにて灌流を行い、つづいて4% パラフォルムアルデヒド/PBS溶液にて灌流固定を行う。
- (ii) 脳を摘出し、同固定液にて1晩の後固定を行い、30%シュクロース/PBS溶液中で4°Cにて浸漬保存する。
- (iii) クリオスタットにて40 μ mの凍結切片を作成し、TBS中に浮遊切片として採取する。
- 10 (iv) ABC法にて免疫染色を行い、プレパラートを作成する。抗体は、神経線維の指標として抗ニューロフィラメント抗体、再生神経線維の指標として抗GAP-43抗体を用いる。
- (v) 顕微鏡で梗塞部の写真を撮影、コンピューターにてデジタルファイル化し、画像解析ソフトにて梗塞巣に含まれる神経線維および再生神経線維の数、あるいは、健康部より梗塞部へと進入する線維の数を定量化する。
- 15

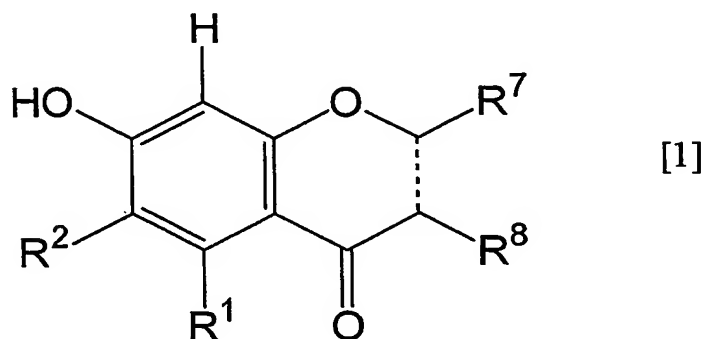
産業上の利用可能性

- 本発明の、ペニシリウム・エスピー (Penicillium sp.) S P F - 3 0 5 9 株を培養することにより得られるセマフォリン阻害活性を有する化合物は、虚血性障害が関与する神経細胞死の抑制作用を示すことから、緑内障、網膜中心動脈閉塞症、網膜中心動脈分枝閉塞症、網膜中心静脈閉塞症、網膜中心静脈分枝閉塞症、虚血性視神経症、糖尿病性網膜症、黄斑変性症、未熟児網膜症等の虚血障害を伴う網膜神経障害に対する予防剤や治療剤として、および、脳塞栓症、一過性脳虚血、鎖骨下動脈盗血症候群、Wallenberg症候群（延髄外側症候群）、脳血栓症、ラクナ梗塞、可逆性虚血性神経障害、脳梗塞、もやもや病（ウィリス動脈輪閉塞症）、低酸素性脳症、静脈洞血栓症、または術後脊髄虚血などの虚血性脳血管障害に対する予防剤や
- 20
- 25

治療剤として有利に用いることができる。

請求の範囲

1. ペニシリウム・エスピー (Penicillium sp.) S P F-3059株を培養することにより得られるセマフォリン阻害活性を有する化合物であって、式[1]：

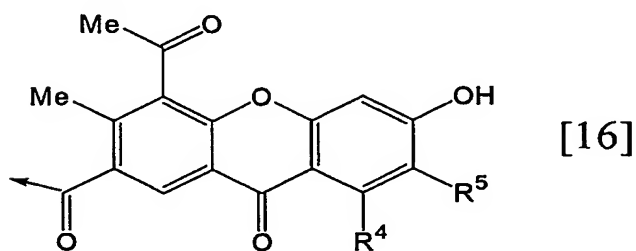


- 5 (式中、破線は単結合若しくは二重結合を表し、 R^1 は水素原子、カルボキシ基又はアルコキシカルボニル基を表し、 R^2 は水素原子、水酸基又はアシルオキシ基を表し、 R^7 及び R^8 は独立して水素原子又は有機基を表す。)

で表される化合物、その誘導体又はそれらの薬学上許容される塩を有効成分として含有する虚血性神経障害治療剤又は予防剤。

- 10 2. 式[1]で表される化合物が、以下の(1)～(3)のいずれかであることを特徴とする請求項1記載の治療剤又は予防剤：

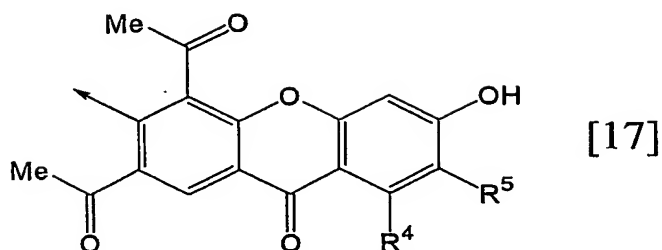
(1) 式[1]において破線は単結合を表し、 R^7 が水素原子を表し、 R^8 が式[16]：



- 15 (式中、 R^4 は水素原子、カルボキシ基又はアルコキシカルボニル基を表し、 R^5 は水素原子、水酸基又はアシルオキシ基を表す。)を表す；

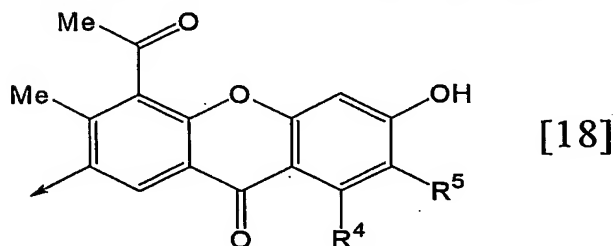
(2) 式[1]において破線は二重結合を表し、 R^7 が水素原子を表し、 R^8 が式[17]：

40

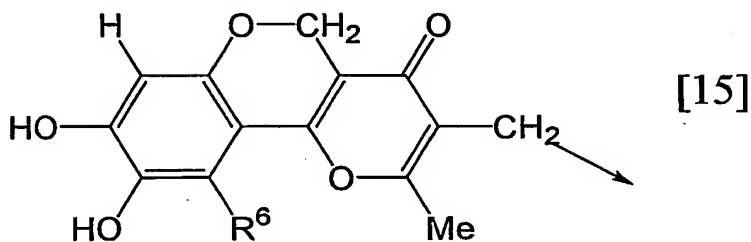


(式中、 R^4 及び R^5 は前記と同義である。) を表す；

(3) 式 [1] において破線は二重結合を表し、 R^7 は式 [18]：

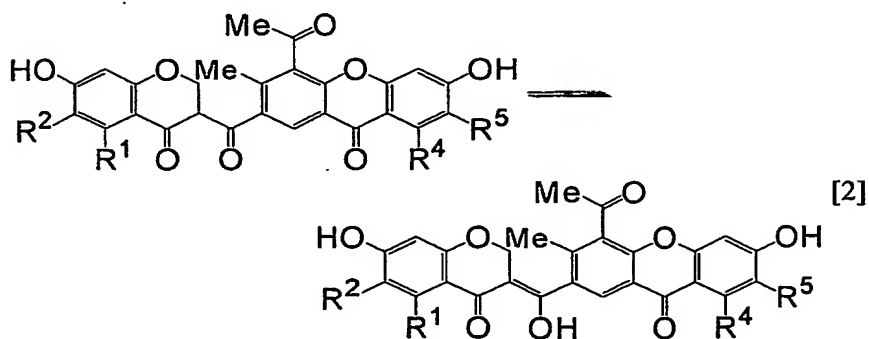


- 5 (式中、 R^4 及び R^5 は前記と同義である。) を表し、 R^8 は水素原子、メトキシメチル基又は式 [15]：



(式中 R^6 は水素原子、カルボキシ基又はアルコキシカルボニル基を表す。) を表す。

- 10 3. 式 [1] で表される化合物が、式 [2]：



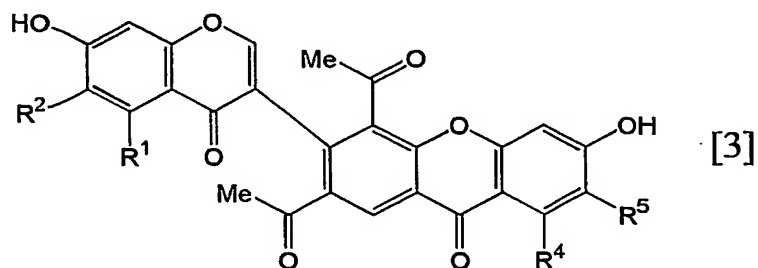
(式中、 R^1 、 R^2 、 R^4 および R^5 は請求項 1 又は 2 と同義である。)

で表される化合物である、請求項 2 に記載の治療剤又は予防剤。

41

4. 式[2]において、 R^1 及び R^4 がカルボキシ基を表し、 R^2 及び R^5 が水酸基を表すことを特徴とする、請求項3に記載の治療剤又は予防剤。

5. 式[1]で表される化合物が、式[3]：

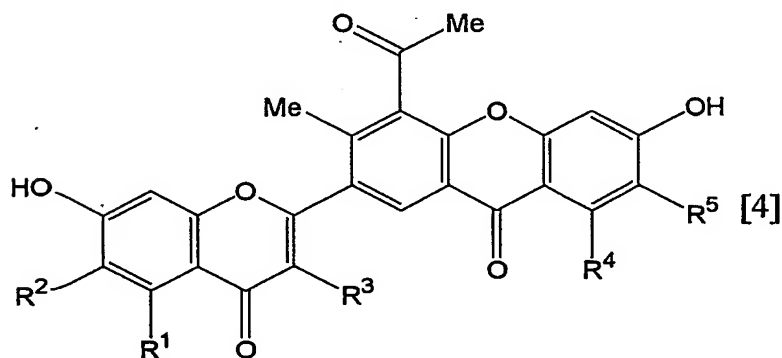


5 (式中、 R^1 、 R^2 、 R^4 および R^5 は請求項1又は2と同義である。)

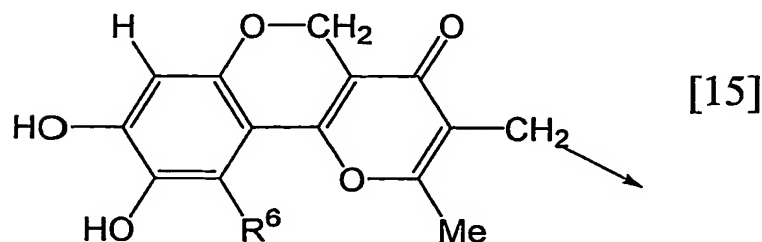
で表される化合物である、請求項2に記載の治療剤又は予防剤。

6. 式[3]において、 R^1 がカルボキシ基又は水素原子を表し、 R^4 がカルボキシ基を表し、 R^2 及び R^5 が水酸基を表すことを特徴とする、請求項5に記載の治療剤又は予防剤。

10 7. 式[1]で表される化合物が、式[4]：



[式中、 R^1 、 R^2 、 R^4 、及び R^5 は、請求項1又は2と同義であり、 R^3 は水素原子、メトキシメチル基又は式[15]：



15 (式中 R^6 は水素原子、カルボキシ基又はアルコキシカルボニル基を表す。)

で表される基を表す。]

で表される化合物である、請求項2に記載の治療剤又は予防剤。

8. 虚血性神経障害が、網膜神経障害である、請求項1～7のいずれか記載の治療剤又は予防剤。

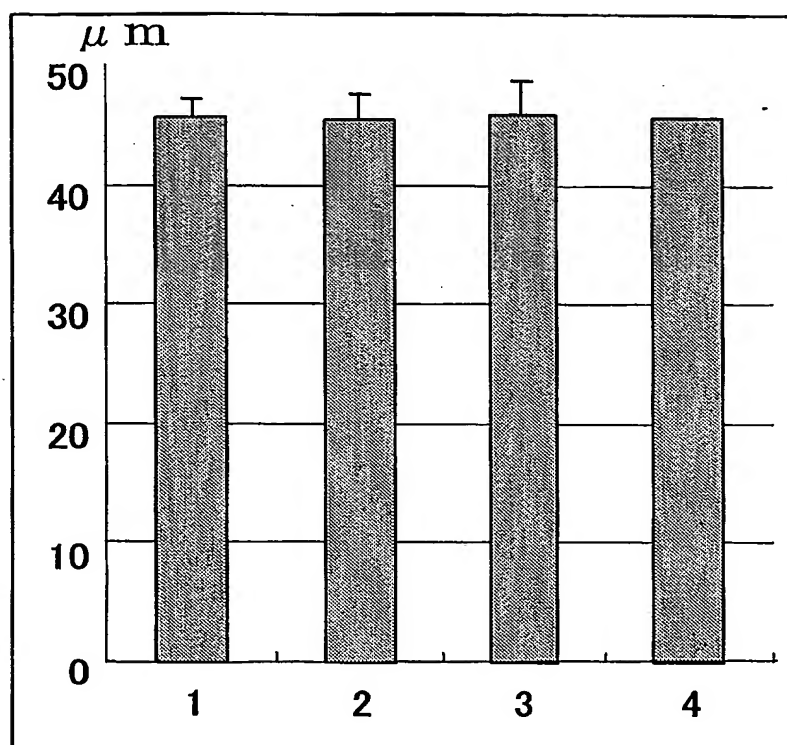
5 9. 網膜神経障害が、緑内障、糖尿病性網膜症、黄斑変性症又は未熟児網膜症である、請求項8に記載の治療剤又は予防剤。

10. 虚血性神経障害が、脳塞栓症、一過性脳虚血、鎖骨下動脈盗血症候群、Wallenberg症候群（延髄外側症候群）、脳血栓症、ラクナ梗塞、可逆性虚血性神経障害、脳梗塞、もやもや病（ウィリス動脈輪閉塞症）、低酸素性脳症、静脈洞血栓症

10 、または術後脊髄虚血である、請求項1～7のいずれか記載の治療剤又は予防剤。

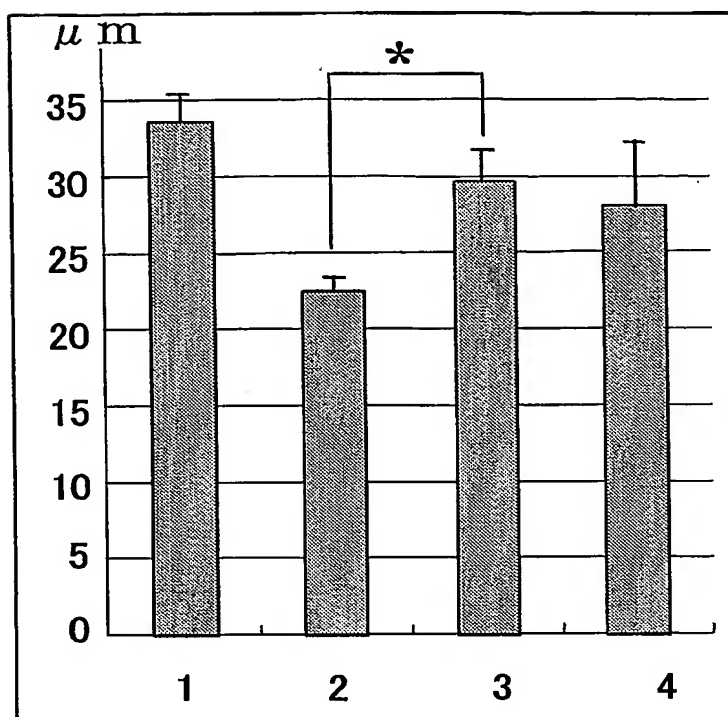
1/8

図 1



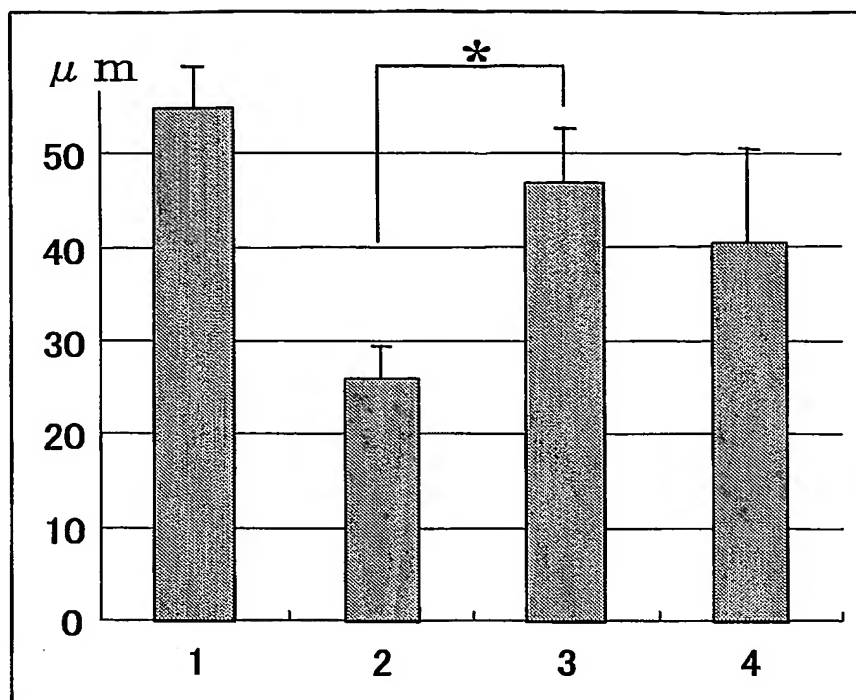
2/8

図 2



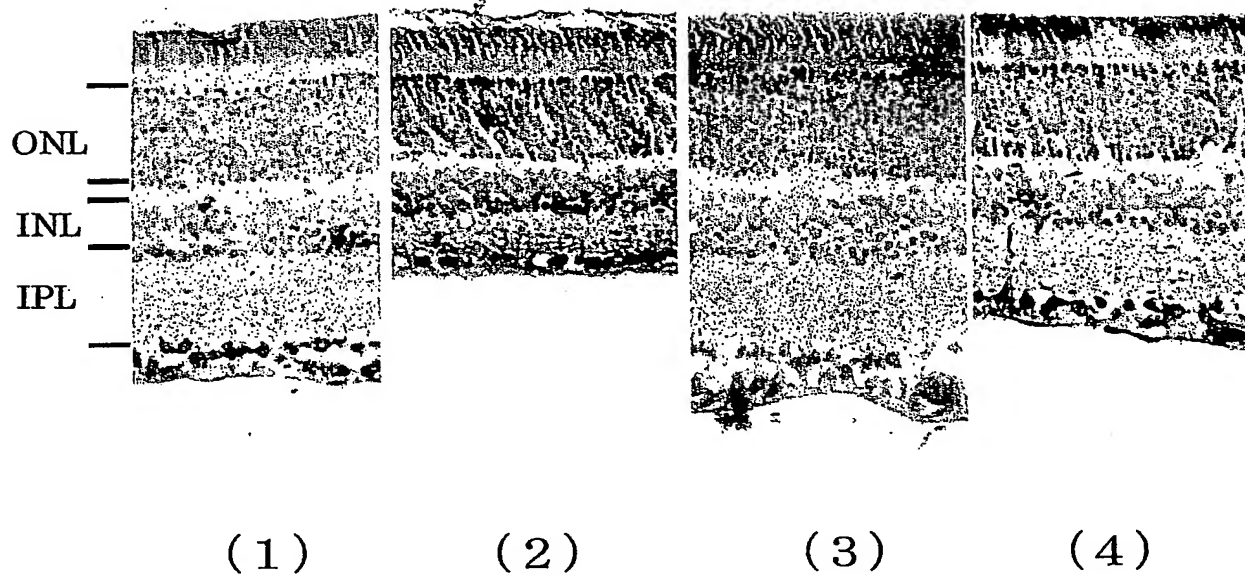
3/8

図 3



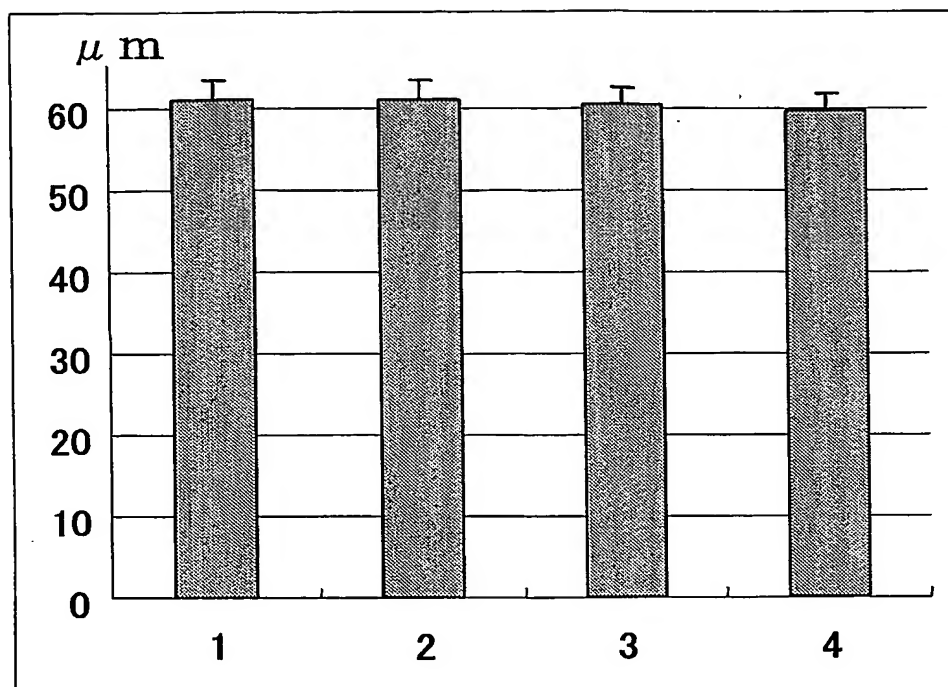
4/8

図 4



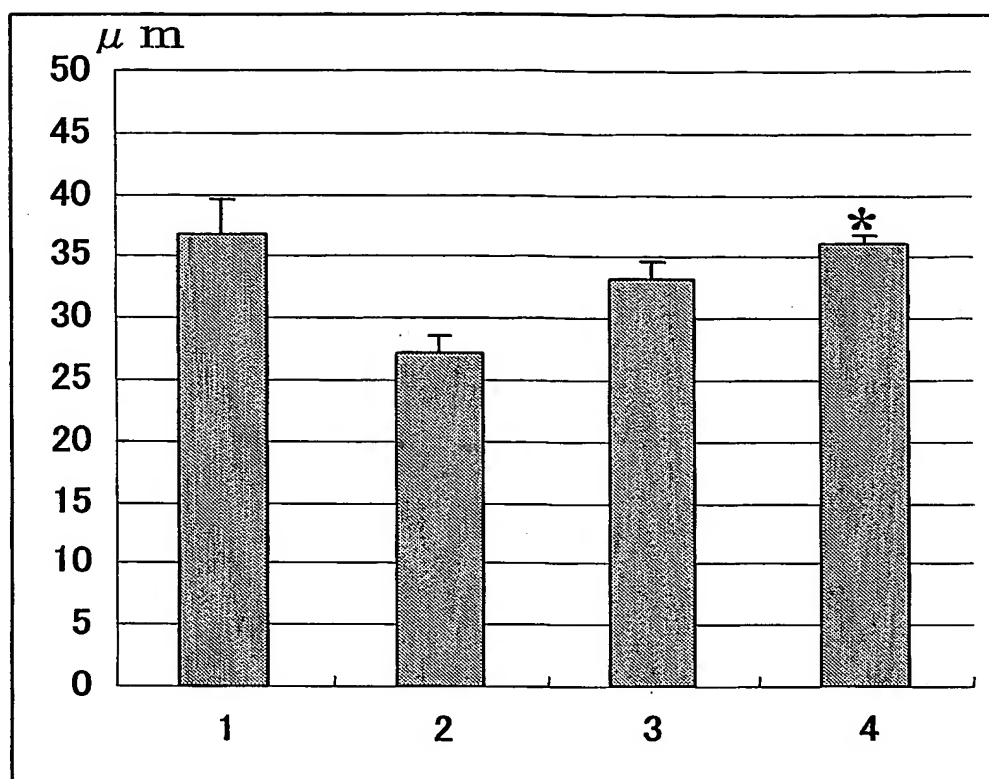
5/8

図 5



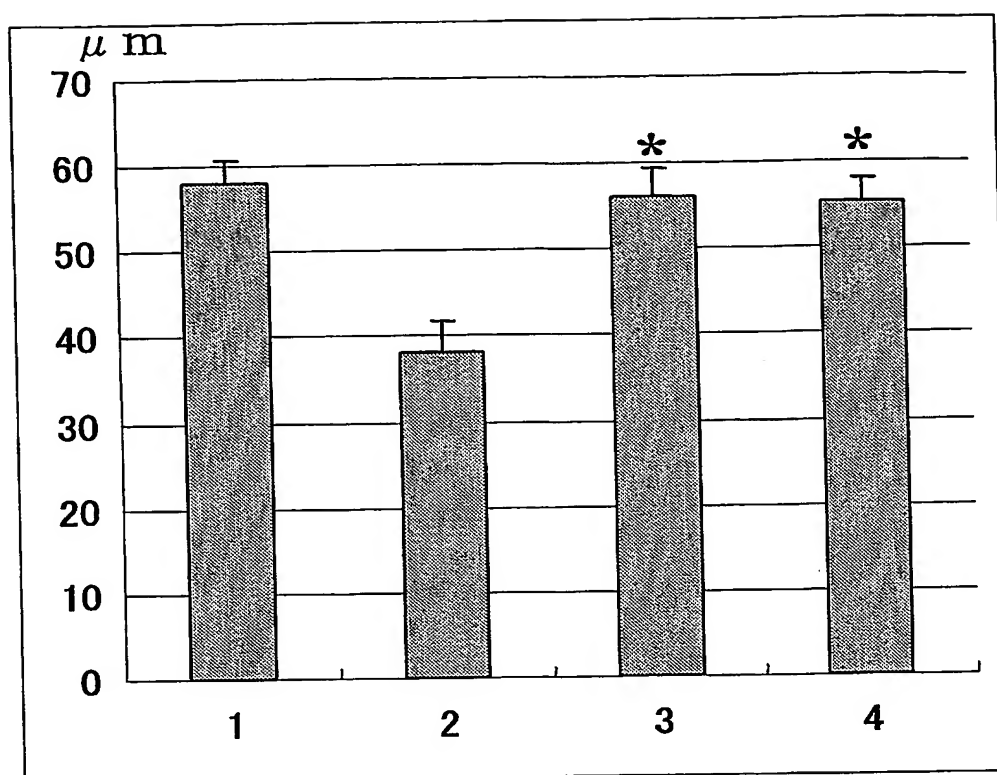
6/8

図 6



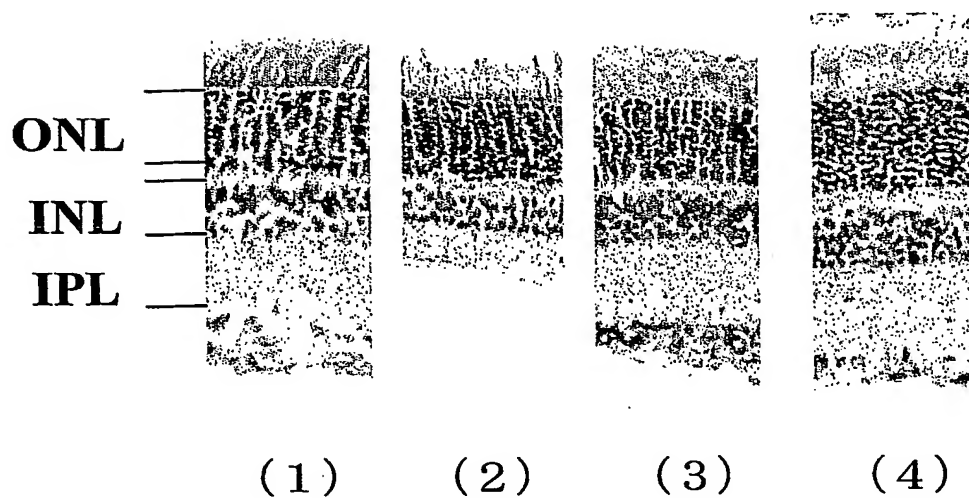
7/8

図 7



8/8

図 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/018114

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/352, C07D311/86, A61P25/00, 27/02, 27/06, 9/10//
C12P17/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/352, C07D311/86, A61P25/00, 27/02, 27/06, 9/10//
C12P17/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2002/009756 A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 07 February, 2002 (07.02.02), Full text; particularly, Claims; pages 21, 26, 42 & EP 1306093 A1	1-10
A	JP 6-506202 A (XENOVA LTD.), 14 July, 1994 (14.07.94), Full text & WO 1992/016517 A1	1-10
A	GAMMON, Guy et al., 'A fungal metabolite which inhibits the interaction of CD4 with major histocompatibility complex-encoded class II molecules.', European Journal of Immunology 1994, Vol.24, No.4, pages 991 to 998	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 February, 2005 (24.02.05)

Date of mailing of the international search report
15 March, 2005 (15.03.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018114

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIKUCHI, Kaoru et al., 'In Vitro and in Vivo Characterization of a Novel Semaphorin 3A Inhibitor, SM-216289 or Xanthofulvin', Journal of Biological Chemistry 2003, Vol.278, No.44, pages 42985 to 42991	1-10
A	NAKAYAMA, T. et al., 'Role of Cdk5 and tau phosphorylation in heterotrimeric G protein-mediated retinal growth cone collapse.', Journal of Neurobiology 1999, Vol.41, No.3, pages 326 to 339	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/352, C07D311/86, A61P25/00, 27/02, 27/06, 9/10//C12P17/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/352, C07D311/86, A61P25/00, 27/02, 27/06, 9/10//C12P17/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO2002/009756 A1 (住友製薬株式会社) 2002.02.07 全文 特に特許請求の範囲及び21, 26, 42頁参照 & EP 1306093 A1	1-10
A	JP 6-506,202 A (ゼノバ リミテッド) 1994.07.14 全文 & WO1992/016517 A1	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24.02.2005

国際調査報告の発送日

15.3.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

瀧野 留香

4P

9048

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	GAMMON, Guy et al. ' A fungal metabolite which inhibits the interaction of CD4 with major histocompatibility complex-encoded class II molecules.' European Journal of Immunology 1994 Vol. 24, No.4, p 991-998	1-10
A	KIKUCHI, Kaoru et al.' In Vitro and in Vivo Characterization of a Novel Semaphorin 3A Inhibitor, SM-216289 or Xanthofulvin' Journal of Biological Chemistry 2003, Vol.278, No. 44, p42985-42991	1-10
A	NAKAYAMA T. et al. 'Role of Cdk5 and tau phosphorylation in heterotrimeric G protein-mediated retinal growth cone collapse.' Journal of Neurobiology 1999 Vol. 41, No. 3 ,p326-339	1-10